



Débora Sofia Fabião Melo

Licenciada em Bioquímica

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS DE QUEIJO DA ILHA DO PICO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE MATURAÇÃO

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves,
Professora Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Doutora Benilde Simões Mendes

Arguente: Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando

Vogal: Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Julho 2014

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS DE QUEIJO DA ILHA DO PICO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE MATURAÇÃO

Copyright, Débora Sofia Fabião Melo

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha Orientadora e Professora Doutora Maria Margarida Gonçalves. Não só me ofereceu este tema como foi muito respeitadora e fléxil com os meus horários, nunca pondo obstáculos e mostrando-se sempre prestativa e compreensiva com o tempo que precisei para me dedicar às restantes cadeiras do meu mestrado, assim como às minhas actividades pessoais.

Em segundo lugar gostaria de deixar um grande agradecimento à Professora Doutora Ana Luísa Fernando pela disponibilização das amostras de queijo e da sua própria disponibilização para quaisquer dúvidas que eu pudesse ter, assim como por toda a ajuda que me deu.

Quero agradecer imenso à minha família por todo o apoio que me demonstrou ao longo do período em que decorreu a tese, assim como em todo o mestrado e também por toda a ajuda que me providenciou.

Por fim, agradeço igualmente a todos os colegas que partilharam o laboratório comigo, em especial à Catarina Nobre e ao João Jesus, por menor ou maior o período de tempo que isso foi e por todo o apoio e disponibilidade que eu bem precisei e que nunca me negaram.

Resumo

Neste estudo procedeu-se essencialmente à determinação e quantificação do perfil de ácidos gordos de um queijo típico português, queijo de S. João da ilha do Pico, assim como a quantificação do teor de gordura bruta presente nas mesmas amostras. Todas as determinações foram efectuadas em função do tempo de maturação do queijo, tendo-se utilizado amostras sujeitas a 8, 17, 28 e 40 dias de maturação.

A quantificação do teor de gordura foi efectuada através da extracção desta de uma amostra de cerca de 2 g de queijo e, de seguida, através da pesagem de um balão, previamente tarado, após se ter submetido 5 mL do extracto de gordura bruta a um rotavapor a 40°C. Estes resultados foram expressos em %, tanto em peso seco como em peso húmido.

A determinação dos ácidos gordos totais foi efectuada através da derivatização do extracto de gordura bruta, obtendo-se ésteres metílicos dos ácidos gordos presentes, e de seguida injectando-se esta amostra num aparelho de GC-MS. Cada éster metílico foi identificado por comparação do seu tempo de retenção com um padrão autêntico (Supelco 500ppm 47885) e por comparação do seu espectro de massa com espectros de padrões das bibliotecas NIST e WILEY, e a sua quantificação foi determinada através da comparação das áreas absolutas obtidas para as amostras de queijo com as áreas obtidas para o padrão Supelco 500ppm 47885, de concentração conhecida.

O ácido linoleico conjugado, mais conhecido por CLA, foi quantificado de forma diferente dos restantes ácidos gordos, tendo sido esta quantificação efectuada através de uma curva de calibração, obtida com soluções de CLA de concentrações conhecidas, nomeadamente 1, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/L, feitas a partir de um padrão O5632 Sigma.

Em relação ao teor de gordura bruta das amostras verificou-se que, em geral, existia um aumento deste parâmetro com a maturação, sendo o seu valor máximo para os queijos com 40 dias e mínimo para os queijos com 8 dias.

O perfil dos ácidos gordos totais revelou que não houve a aparição ou perda de nenhum destes componentes do queijo ao longo dos diferentes tempos de maturação, apenas se verificando alterações na sua concentração.

A concentração dos ácidos gordos totais apresentou a mesma situação que o teor de gordura, aumentando com a maturação do queijo, sendo que os que apresentaram uma maior variação foram os ácidos palmítico, esteárico, mirístico, vacénico e o ácido linoleico conjugado. Coincidentemente, estes mesmos ácidos gordos são os que se apresentam em maior concentração nas amostras de queijo de diferentes períodos de maturação.

Palavras-chave: Queijo de S. João da ilha do Pico, gordura bruta, ácidos gordos totais, período de maturação.

Abstract

In this study it was determined and quantified the total fatty acid profile of a typical Portuguese cheese, S. João ilha do Pico cheese, and the quantification of total fat present in samples with different ripening periods, namely 8, 17, 28 and 40 days.

The quantification of total fat was obtained by extraction of the total fat from about 2 g of the cheese samples and by weighing a balloon, previously weighted, after it was subjected to a rotary evaporator at 40°C. The quantity of fat used was 5 mL. The results were expressed in %, both in dry weight as in wet weight.

The determination of total fatty acids was obtained by derivatization of the total fat extract, resulting in the methyl esters of the fatty acids present in the cheese samples. The sample was injected in a GC-MS equipment. Each methyl ester was identified by comparison of its retention time with an authentic standard (Supelco 500ppm 47885) as by comparison of its mass spectrum with mass spectrum obtained from the libraries NIST and WILEY. The quantification of the methyl esters was determined by comparison of the absolute areas obtained for the samples and the absolute areas obtained with the standard Supelco 500ppm 47885, with known concentration.

The conjugated linoleic acid, commonly known as CLA, was quantified in a different way, more precisely through the attainment of a calibration curve obtained by standard solutions of this fatty acid. The standard solutions used had the following concentrations 1, 2, 4, 6, 8 and 10 mg/L and were made from the standard O5632 Sigma.

The results obtained for the fat content showed that, in general, its amount increased throughout the ripening process, being its value maximum for the 40 day cheeses e minimal for the 8 day cheeses.

Regarding the total fatty acid profile, results showed that during the different periods of ripening there was no fatty acid that appeared or disappeared, only its concentration changed.

The concentration of fatty acids showed the same results as the total fat, increasing its value along the ripening process. The fatty acids that varied the most were palmitic, stearic, myristic, vaccenic e conjugated linoleic acids. Coincidentally, these same fatty acids are present in higher concentrations than the other fatty acids in cheese samples from different stages of maturation.

Keywords: S. João ilha do Pico cheese, total fat, total fatty acids, ripening period.

Índice de Matérias

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de Matérias	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xv
1. Introdução	1
1.1. Composição e características nutricionais de queijo	3
1.2. Níveis de produção nacional e mundial de queijo	7
1.3. Processo de produção de queijo	7
1.3.1. Tipos de queijo	9
1.4. Variação na composição e propriedades do queijo em função do processo de produção	11
1.4.1. Efeito da alimentação do animal em função da estação do ano	11
1.4.2. Efeito da congelação	12
1.4.3. Efeito do inóculo	13
1.4.4. Efeito da temperatura de maturação	13
1.4.5. Efeito do tipo de embalagem	14
1.4.6. Efeito do tipo de leite em função da espécie animal	15
1.4.7. Efeito do tipo de leite em função da raça animal	16
1.5. Componentes do aroma do queijo	17
1.6. Técnicas analíticas utilizadas na caracterização do aroma de queijo	29
1.6.1. GC-MS	29
2. Materiais e Métodos	33
2.1. Fabrico do queijo	33
2.2. Determinação do teor em proteínas, cinzas e humidade	34
2.3. Extração da gordura bruta	34
2.4. Determinação do teor de gordura	35
2.5. Derivatização dos ácidos gordos totais	35
2.6. Preparação das soluções padrão de CLA	36
2.7. Tratamento Estatístico	36
3. Resultados e Discussão	37
3.1. Amostragem e sua composição química	37
3.2. Teor de gordura	39

3.3. Determinação do perfil de ésteres metílicos de ácidos gordos de queijo de S. João da ilha do Pico com diferentes tempos de maturação	41
4. Conclusão	53
5. Bibliografia	55
6. Anexos	63
6.1. Cromatogramas de perfis de ácidos gordos totais.....	63

Índice de Figuras

Figura 1.1: Estruturas dos ácidos: a) linoleico, b) eicosapentaenóico, c) docosahexaenóico e d) linoleico conjugado.....	6
Figura 1.2: Tipos de queijo produzidos actualmente (Fox et al., 2000).....	11
Figura 1.3: Esquematização dos componentes de um aparelho de GC-MS (McMaster, 2008).....	30
Figura 3.1: Teor de humidade das amostras de queijo de S. João da ilha do Pico estudadas.	38
Figura 3.2: Cromatogramas obtidos para os ésteres metílicos dos ácidos gordos de amostras de queijo de S. João da ilha do Pico com (a) 8 dias de maturação e (b) 40 dias de maturação.	42
Figura 3.3: Cromatograma obtido para o padrão Supelco 500ppm 47885.	45
Figura 3.4: Curva de calibração do ácido linoleico conjugado.	47
Figura 3.5: Evidência da presença de CLA nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico estudadas neste trabalho prático.....	51
Figura 3.6: Teor de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados presentes nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico em função do tempo de maturação.	52
Figura 6.1: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo A-8.	63
Figura 6.2: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo A-17.	63
Figura 6.3: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo A-28.	64
Figura 6.4: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo A-40.	64
Figura 6.5: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo B-8.	65
Figura 6.6: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo B-17.	65
Figura 6.7: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo B-28.	66
Figura 6.8: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo B-40.	66

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Ácidos orgânicos, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Buffa et al., 2004; 2: Califano & Bevilacqua, 2000; 3: Park & Drake, 2005; 4: Ong & Shah, 2009; 5: Manolaki et al., 2006; 6: Califano & Bevilacqua, 1999.....	18
Tabela 1.2: Ácidos gordos, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Akin et al., 2003; 2: Partidário et al., 1998; 3: Kondyli et al., 2013; 4: Mallatou et al., 2003; 5: Bontinis et al., 2012; 6: Delgado et al., 2011.	20
Tabela 1.3: Álcoois, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Delgado et al., 2011; 2: Bontinis et al., 2012; 3: Ziino et al., 2005; 4: Kondyli et al., 2013.	22
Tabela 1.4: Ésteres, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Delgado et al., 2011; 2: Bontinis et al., 2012; 3: Ziino et al., 2005.	24
Tabela 1.5: Cetonas, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Delgado et al., 2011; 2: Bontinis et al., 2012; 3: Ziino et al., 2005; 4: Kondyli et al., 2013.	26
Tabela 1.6: Aldeídos, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Bontinis et al., 2012; 2: Ziino et al., 2005; 3: Kondyli et al., 2013.	27
Tabela 1.7: Compostos voláteis, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Ziino et al., 2005; 2: Kondyli et al., 2013.	28
Tabela 1.8: Técnicas utilizadas para a análise dos diferentes compostos do aroma de diferentes tipos de queijo.....	29
Tabela 2.1: Concentração final de CLA e volume de solução-mãe pipetado para os respectivos balões de 25 mL.	36
Tabela 3.1: Identificação das amostras de queijo de S. João da ilha do Pico incluídas neste trabalho. ...	37
Tabela 3.2: Teor médio de gordura presente nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico de dois lotes diferentes e respectivos desvios padrão.	39
Tabela 3.3: Teor médio de gordura presente nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico e respectivos desvios padrão em função do tempo de maturação.	39
Tabela 3.4: Ácidos gordos totais evidenciados nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico estudadas e respectivas janelas de retenção.....	43
Tabela 3.5: Ácidos gordos identificados no padrão Supelco 500ppm 47885, janelas de retenção e respectivas concentrações.....	46
Tabela 3.6: Variação da concentração, em função do tempo de maturação, dos ácidos gordos presentes nas amostras estudadas.	47

1. Introdução

O queijo é um produto alimentar produzido há mais de 5000 anos, existindo actualmente acima de 500 variedades. Anualmente, 35% do leite produzido a nível mundial é utilizado na produção deste produto lácteo, que é um componente predominante na dieta humana (Fox et al., 2000).

Segundo a Portaria 73/90 de 1 de Fevereiro, queijo é definido como um produto alimentar fresco ou curado, de consistência variável (dependendo do processo e condições de produção, origem do leite, ingredientes utilizados, entre outros factores), obtido por coagulação e dessoramento do leite (leite total ou parcialmente desnatado, mesmo que reconstituído) e da nata, do leitelho bem como da mistura de alguns ou de todos estes produtos, incluindo o lactossoro, sem ou com adição de outros géneros alimentícios.

O queijo é considerado um alimento quase completo, podendo apresentar uma digestibilidade, ou seja, absorção de matérias pelo organismo, de 97-99% e é constituído essencialmente por caseína, água, gorduras e sais (Lidon & Silvestre, 2007).

Este alimento pode ser classificado quanto à cura, à composição, à consistência e quanto à matéria gorda.

Em relação à cura, o queijo pode-se dividir em:

1) Queijo curado – só se encontra apto para consumo depois de mantido durante um certo tempo em condições determinadas de temperatura, humidade e ventilação, as quais permitam modificações químicas e físicas características;

2) Queijo curado por acção de bolores – as suas características são devidas à proliferação de bolores específicos no interior e/ou superfície do queijo;

3) Queijo fresco – é obtido por coagulação e dessoramento do leite por fermentação láctica, com ou sem adição de coalho e não submetido a um processo de cura. Este tipo de queijo deve ser fabricado obrigatoriamente com leite pasteurizado (Portaria 73/90 de 1 de Fevereiro).

De acordo com a sua composição, o queijo divide-se em 2 classes:

1) Queijo sem adição de géneros alimentícios diferentes do queijo;

2) Queijo com adição de géneros alimentícios diferentes do queijo.

Levando em conta a sua consistência, o queijo é classificado em função da sua percentagem de humidade, podendo ser de pasta mole (humidade superior a 67%), de pasta semimole com uma humidade relativa entre 61 e 69%, de pasta semidura com humidades relativas de 54 a 63%, de pasta dura (49-56%) e extraduro (máximo de humidade de 51%) e, no caso da matéria gorda, o queijo é classificado em função da percentagem desta no extracto seco, dividindo-se em cinco categorias:

1) Muito gordo ou extra gordo, com uma percentagem de matéria gorda superior a 60%;

2) Gordo (45-60%);

3) Meio gordo (25 a 45%);

4) Pouco gordo (10 a 25% de matéria gorda);

5) Magro, com um valor máximo de 10% (Portaria 73/90 de 1 de Fevereiro).

Os ingredientes utilizados no fabrico de queijo dependem do tipo de queijo que se pretende obter, podendo incluir um coagulante adequado, tal como coalho animal ou outra enzima coagulante segura para a saúde do Homem, culturas de microrganismos (bactérias lácticas, leveduras e bolores), leite em pó, nata, leiteiro, lactossoro, proteínas do soro, caseína e caseinatos, sal comum, seja purificado seja refinado, cloreto de cálcio (dose máxima de 200 mg/L de leite), bicarbonato e carbonato de sódio, bicarbonato e carbonato de cálcio (dose máxima de 30 mg/Kg de coalhada ácida), acidificantes tais como ácido acético (E260), ácido láctico (E270) e ácido cítrico (E330) no queijo fresco, corantes (podem ser directamente adicionados ao queijo – α , β e γ -caroteno – ou à sua casca – corante orgânico sintético pigmento rubi ou litol rubina BK – ou podem ser transferidos aquando se adiciona outros géneros alimentícios ao queijo), outros géneros alimentícios que confirmam caracteres organolépticos próprios (não podem ultrapassar 1/6 da massa do produto acabado), especiarias, aromatizantes naturais ou os seus equivalentes de síntese e outros condimentos vegetais para conferirem caracteres organolépticos próprios, entre outros ingredientes (Portaria 73/90 de 1 de Fevereiro).

Conforme a sua composição e dentro desta conforme a sua percentagem de água livre (Aw), os diferentes queijos devem ser conservados a uma temperatura de 0-6°C para o caso do queijo fresco, a uma temperatura máxima de 10°C para o caso do queijo de cura e durante o seu transporte, não se devem atingir temperaturas superiores a 8-10°C e 14°C, respectivamente (Portaria 73/90 de 1 de Fevereiro).

O queijo é um dos produtos alimentares mais complexos e dinâmicos e o seu estudo envolve aspectos analíticos, físico-químicos, bioquímicos, microbiológicos, reológicos e sensoriais. Assim sendo, é de notar que tantos estudos tenham sido realizados ao longo dos anos sobre este alimento, em especial com foco na sua produção e maturação (Fox et al., 2000).

Neste trabalho procedeu-se ao estudo das alterações a nível dos ácidos gordos totais do Queijo de S. João da ilha do Pico ao longo da sua maturação.

Este queijo é produzido em pequenas empresas familiares, nos Açores, nomeadamente na Ilha do Pico, a partir de leite de vaca pasteurizado. Este queijo é curado e resulta de um esgotamento lento da coalhada após coagulação do leite; a sua maturação ocorre em condições controladas, normalmente a uma temperatura entre os 10°C e 14°C e num ambiente com uma humidade relativa que oscila entre 80% e 85% (www.azores.gov.pt).

1.1. Composição e características nutricionais de queijo

O queijo é rico em vários nutrientes essenciais, tais como proteínas, cálcio, zinco, fósforo, magnésio, vitamina A (lipossolúvel), vitamina B2 (riboflavina) e vitamina B12.

As quantidades e os nutrientes presentes nos diferentes tipos de queijo dependem da composição do leite e do processo de fabrico (Geissler & Powers, 2010; Miller et al., 2000).

Os nutrientes mais importantes encontrados no queijo são: proteínas, as quais são importantes no crescimento e desenvolvimento e ajudam na construção e reparação dos diferentes tecidos do corpo; cálcio, importante na saúde dos dentes e ossos e para o funcionamento dos músculos e nervos; zinco, contribui para a estrutura da pele e pode contribuir para a cicatrização de feridas assim como para o bom funcionamento do sistema imunitário; fósforo, igualmente importante para os dentes e ossos; vitamina A, importante na visão, na manutenção da pele e importante para os ossos; vitamina B2, envolvida nos processos de conversão de comida em energia e vitamina B12, responsável pela produção de células, tais como glóbulos vermelhos ou hemácias (Lidon & Silvestre, 2010).

É de notar que existe mais do que um nutriente essencial do queijo que é importante para a manutenção dos dentes. De facto, o cálcio, fósforo e proteínas do queijo ajudam a bloquear a acumulação de ácido formado após o consumo de alimentos ricos em açúcares pela acção de bactérias que convertem o açúcar e amido em ácido que degrada a camada protectora externa dos dentes e, contribuem para a restituição de minerais nos dentes, nomeadamente cálcio e fósforo que são perdidos devido à degradação da camada exterior dos dentes. Para além destas contribuições, estes nutrientes também promovem a secreção de saliva, a qual permite uma redução de doenças do fórum dental (Herod, 1991; Kashket & DePaola, 2002; Moynihan et al., 1999).

A lactose é um dos principais constituintes do leite, mas, apesar do queijo ser feito a partir deste, a lactose não é predominante no queijo, existindo em pequenas quantidades. A lactose não é facilmente digerida por quem não produza lactase em quantidade suficiente, uma vez que esta enzima é responsável pela degradação deste glicérido (Jarvis & Miller, 2002; McBean & Miller, 1998; Pribila et al., 2000).

A baixa quantidade de lactose presente no queijo por comparação com o leite deve-se à remoção do soro de leite coalhado, após a etapa de coagulação aquando a produção de queijo. É no soro que a maior parte da lactose se encontra, pois sendo um dissacarídeo é bastante solúvel em meio aquoso.

Nos queijos maturados, a quantidade de lactose ainda é menor uma vez que esta é convertida em ácido láctico e outros produtos durante o período de maturação. Contudo, se forem adicionados ingredientes facultativos como leite magro por exemplo, a concentração de lactose aumenta nestes queijos (Miller et al., 2000).

Dito isto, é de se concluir que, para pessoas que são intolerantes à lactose, o queijo é uma boa alternativa ao leite como fonte de cálcio na alimentação diária.

Os ossos do corpo humano são constituídos em grande parte por cálcio, fosfato e proteínas. Como já foi referido, o queijo é uma boa fonte destes três elementos o que contribui para fornecer estes elementos durante desde a infância à adolescência, período onde o crescimento e desenvolvimento dos ossos são mais acentuados e durante a nossa fase adulta até sermos idosos, que são idades caracterizadas por um desgaste crescente no esqueleto, sendo então necessário um grande fornecimento destes nutrientes (Heaney, 2000; Miller et al., 2000).

Para além dos nutrientes já referidos, o queijo também é uma importante fonte de ácido linoleico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (Wijendram & Hayes, 2004).

O ácido linoleico, C18:2, é um ácido gordo essencial para humanos, especialmente no crescimento, desempenhando um papel benéfico para a saúde geral humana (Choque et al., 2014), prevenindo aterosclerose, reduzindo os níveis de gordura no sangue, diminuindo a probabilidade de doenças cardíacas coronárias, entre outras funções (Ya et al., 2014). Um dos seus muitos metabolitos, o ácido araquidónico, é um precursor de prostaglandinas e outros compostos fisiologicamente importantes (Shimizu et al., 2014).

Contudo este ácido gordo também pode ser prejudicial para a nossa saúde: alguns dos seus metabolitos são adversos podendo promover doenças de natureza inflamatória e este ácido em si também pode reduzir a conversão do ácido α -linolénico em ácidos gordos poliinsaturados, como por exemplo, EPA e DHA (Choque et al., 2014). Outro inconveniente deste composto é que, embora não esteja envolvido na iniciação do desenvolvimento de tumores, pode influenciar a sua progressão, geralmente de forma positiva para o tumor, estando assim envolvido em diversos tipos de cancro (Mouradian et al., 2014).

O ácido eicosapentaenóico, EPA, segundo Ma e colaboradores (Ma et al, 2014), contribui para a redução do colesterol e na prevenção e tratamento de doenças no sistema circulatório como por exemplo aterosclerose. Este ácido gordo também é responsável pela redução da mortalidade por doenças cardiovasculares, uma vez que reduz o risco destas se desenvolverem (Richard et al., 2014).

Este ácido poliinsaturado pode ser utilizado no tratamento de depressões, tornando-se uma alternativa aos medicamentos actualmente utilizados, apresentando um menor grau de efeitos secundários que estes mesmos. Este tratamento com EPA torna-se possível uma vez que já foi comprovado que este apresenta efeitos benéficos em indivíduos com distúrbios comportamentais, tais como depressão (Mozaffari-Khosravi et al., 2013).

O EPA é um dos principais componentes de membranas neuronais e apresenta uma grande gama de funções, tais como a modulação da plasticidade e química sináptica assim como a modulação e protecção neurológica. Assim sendo, este composto, para além dos benefícios já descritos, também é benéfico contra alguns tipos de cancro, doença de Parkinson e declínio cognitivo (Wu & He, 2014).

O ácido docosahexaenóico, DHA, desempenha efeitos benéficos contra diversos distúrbios auto-imunes e inflamatórios. Este composto, em grandes quantidades, inibe a proliferação celular, induz a

apoptose através da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e inibe a síntese de DNA em tumores, o que confere a este ácido poliinsaturado um carácter anticancerígeno (Cui et al., 2014).

DHA encontra-se concentrado nas membranas das células do sistema nervoso central, sendo um composto neuroprotector, fornecendo um carácter protector e promotor de recuperação após um AVC (Hong et al., 2014). Outras funções incluem modulação da plasticidade e química sináptica e modulação neurológica (Wu & He, 2014).

Tal como no caso do ácido anteriormente referido, este ácido apresenta igualmente propriedades nutracêuticas tais como redução do colesterol (Ma et al., 2014), tratamento de depressão e de outros distúrbios comportamentais (Mozaffari-Khosravi et al., 2013), prevenção e tratamento de distúrbios no sistema circulatório e de doenças cardiovasculares, estando associado a uma redução da mortalidade devida a este tipo de problemas (Ma et al., 2014; Richard et al., 2014; Yamagata et al., 2014).

Outro composto presente no queijo é o ácido linoleico conjugado, CLA, (Belury, 2002; Parodi, 2003). A sua forma cis-9, trans-11 é a que ocorre naturalmente em produtos alimentares, podendo ser encontrada na fracção lipídica de carnes, leite e produtos lácteos, de que é exemplo o queijo (Draper et al., 2014).

Foi reportado, através de experiências em animais, que a ingestão diária mínima de CLA necessária para que se façam sentir os seus efeitos benéficos, em humanos, é de 10 a 11,5 mg/kg de massa corporal (Watkins & Li, 2003). Os seus efeitos benéficos são sentidos no combate contra doenças inflamatórias e de origem imunológica (Draper et al., 2014) e este composto desempenha funções anticancerígenas, assim como protectoras contra a obesidade e doenças cardíacas (El-Salam & El-Shibiny, 2014), diabetes (tipo II) e hipertensão (Koba & Yanagita, 2013).

O CLA pode ser ingerido em quantidades inferiores à dose estipulada e ainda assim pode existir no nosso organismo, numa concentração suficiente para exercer os seus efeitos benéficos, uma vez que o ácido vacénico (C18:1) também pode ser convertido neste ácido gordo pela enzima *desaturase da estearil-CoA* (El-Salam & El-Shibiny, 2014).

As estruturas dos ácidos gordos referidos estão representadas na figura 1.1.

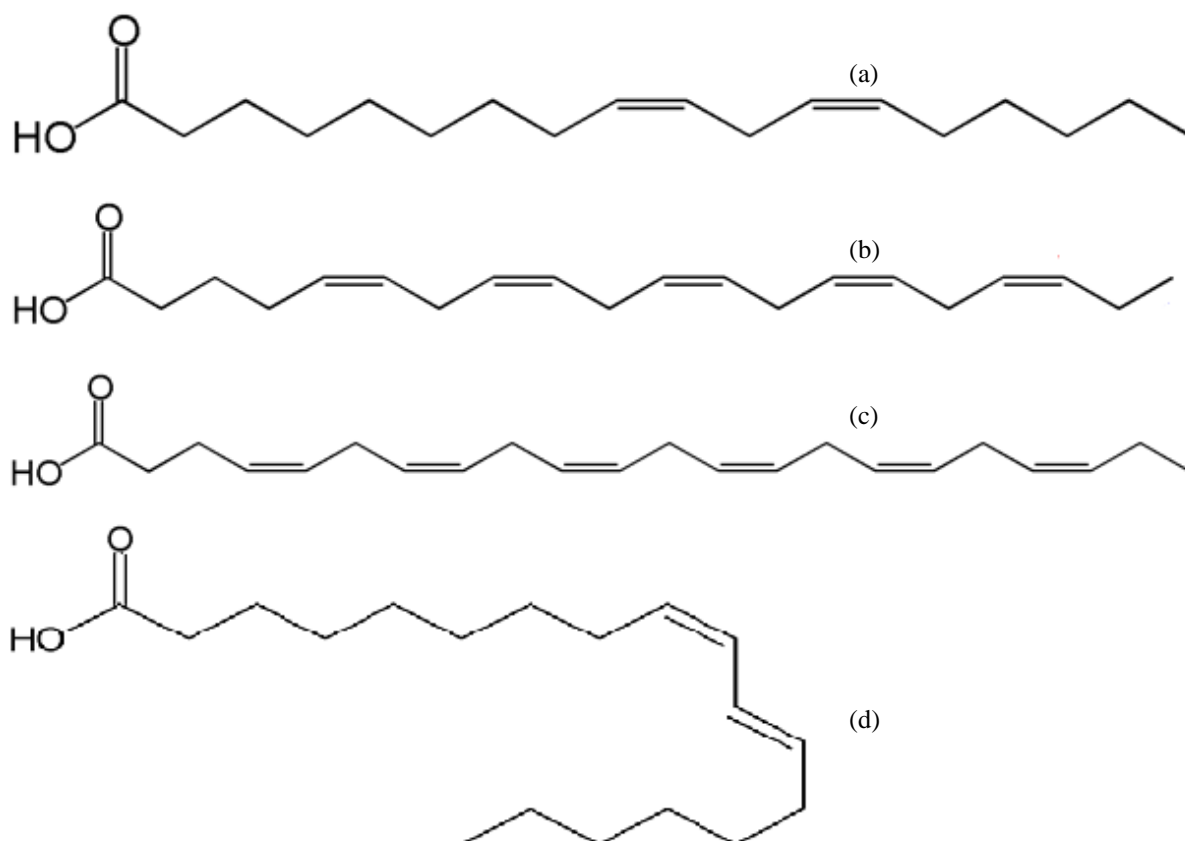


Figura 1.1: Estruturas dos ácidos: a) linoleico, b) eicosapentaenóico, c) docosahexaenóico e d) linoleico conjugado.

1.2. Níveis de produção nacional e mundial de queijo

O queijo é um produto alimentar produzido a nível mundial em grande escala, sendo específico para cada país.

Em 2010, a nível mundial, foram produzidas 20698000 toneladas de queijo. Destes 21 milhões de toneladas, apenas 75 mil foram produzidas em Portugal, correspondendo a cerca de 0,36% da produção mundial. Neste ano, em particular, a Europa foi o continente com uma maior produção de queijo, tendo contribuído com cerca de 10 milhões de toneladas, ou seja, 50% da produção neste ano.

Dentro da Europa, o país que maior quantidade de queijo produziu em 2010 foi a Alemanha com uma produção de 2 milhões de toneladas, seguindo-se a França em segundo lugar e a Itália em terceiro com uma produção de cerca de 2 milhões de toneladas e 1 milhão de toneladas, respectivamente (FAO, 2012).

Relativamente a Portugal, produziram-se 70 mil toneladas, mais especificamente 72,24 mil em 2011 e 71,88 mil em 2012, tendo-se evidenciado um decréscimo na produção deste alimento de um ano para o seguinte. Ao longo da década de 2000, a produção variou, decrescendo em alguns anos e aumentando noutros, tendo atingido um valor máximo em 2006, com uma produção de 69 mil toneladas.

Em 2011, Portugal contribuiu com 0,80% da produção europeia, tendo-se destacado neste ano a Alemanha com 23% da produção e a França e a Itália com 21% e 13%, respectivamente, de um total de 9 milhões de toneladas. Uma situação semelhante é demonstrada para o ano 2012, em que Portugal contribuiu com 0,78% da produção europeia e a Alemanha efectuou 23% da produção e a França e a Itália 21% e 13%, respectivamente, sendo os três países com maior produção neste ano. Em 2012 a produção europeia de queijo foi de 9,3 milhões de toneladas (Eurostat, 2013).

1.3. Processo de produção de queijo

Na produção de queijo, a refrigeração do leite durante o seu transporte e armazenamento, é essencial e deve ser realizada a uma temperatura de 4°C. Antes de ser usado para se produzir queijo, o leite deve sofrer processos de clarificação, separação e padronização, com uma eventual recorrência a centrifugação. Após estes processos, efectua-se o controlo microbiológico do leite, que envolve a realização de uma pasteurização a uma temperatura de 65-70°C durante um curto período de 15-30 segundos. É preciso ter muita atenção à temperatura a que o leite está exposto e ao tempo de exposição de forma a se evitar a desnaturação das proteínas do soro e a precipitação do fosfato de cálcio. Esta última é prejudicial à formação da coalhada e do dessoramento.

Apesar de ser um processo que exige controlo, a pasteurização é importante pois, embora as bactérias lácticas sejam essenciais no fabrico de queijo, existem outros microrganismos (tais como

coliformes e fungos) que quando presentes no leite são prejudiciais para a qualidade do queijo e/ou para a saúde humana.

De seguida procede-se ao adicionamento do inóculo – *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis* ou *Streptococcus cremoris*. Com este passo promove-se a formação de ácido láctico, com uma consequente diminuição do valor de pH da matéria, o que se traduz numa facilitação da coagulação e melhoramento do sabor e textura do queijo. Entre a adição do inóculo e antes da formação da coalhada pode-se adicionar cloreto de sódio, tanto como facilitador da coagulação e endurecimento do queijo, como conservante e para conferir um específico sabor. A concentração deste aditivo não deve ultrapassar os 200 mg/L de leite.

É nesta etapa que se adiciona o agente coagulante e de seguida mais leite, de forma a evitar a separação da gordura, e deixa-se assentar e em repouso, a 25-30°C, durante um período que pode ir dos 30 minutos a uma hora. No fim deste processo forma-se a coalhada e o soro. Dependendo do tipo de queijo que queremos, o processo de coagulação pode ser lento e, realizado a temperaturas relativamente baixas no caso dos queijos de barrar, ou elevadas no caso de queijos duros. Estes últimos apresentam um período de maturação longo.

De seguida efectua-se o dessoramento de forma natural, decorrente da descida de pH devido à fermentação láctica, ou mediante aceleração, recorrendo ao corte (para facilitar a saída do soro), aquecimento e agitação ou prensagem. Nesta fase também ocorre a moldagem do queijo e o subsequente arrefecimento.

Dependendo do tipo de queijo que se pretende produzir, após estas etapas pode ocorrer um armazenamento prolongado durante o qual se processa a maturação, ou não e promove-se a expedição do produto final, neste caso o queijo fresco. Para queijos curados, a maturação processa-se em câmaras de cura, a uma temperatura entre 5 e 12°C e humidade relativa de cerca de 90%. A maturação pode durar desde horas a anos e, durante esta, ocorre a viragem e lavagem dos queijos para se evitar a deformação e desidratação irregular da massa e para remover camadas bolorentas que se possam formar (Lidon & Silvestre, 2007).

O processo de produção do Queijo de S. João da ilha do Pico inicia-se pela filtração do leite pasteurizado proveniente de vacas dos Açores, caindo este directamente nas tinas de fabrico. O leite é aquecido ou arrefecido, conforme o caso, até se encontrar a uma temperatura entre 26-27°C, ideal para o início da coagulação.

A coagulação ocorre por adição de coalho animal, previamente dissolvido em água, e sal e, é conseguida após 45-60 minutos da adição destes.

De seguida procede-se ao corte da coalhada com uma espátula ou uma lira, de forma a quebrar em cubos de pequena dimensão a coalhada, permitindo assim a saída do soro. Após o corte, que é um processo rápido, efectua-se a moldagem e prensagem manual do produto. O soro resultante destas operações é guardado e utilizado na alimentação de gado.

A salga é realizada por adição de sal grosso na superfície do queijo, o que possibilita a formação de uma casca resistente. Adicionam-se 21 gramas de sal por cada face do queijo.

Por fim, o queijo é submetido ao processo de cura em câmaras de frio, onde são voltados duas vezes por dia, uma vez de manhã e outra à tarde (www.azores.gov.pt).

1.3.1. Tipos de queijo

Dependendo do processo de produção optado, podem-se obter os seguintes tipos de queijo: queijos obtidos por coagulação ácida, com ou sem tratamento térmico e queijos de coalho coagulado. Dentro destes últimos podem-se ainda obter queijos amadurecidos internamente por bactérias (dividindo-se em queijos muito duros, duros, semiduros, queijos com “olhos”, queijos ricos em sal e queijos *pasta-filata*), queijos amadurecidos por acção de bolores (à superfície ou internamente) e queijos amadurecidos à superfície (Fox et al., 2000).

Falando de cada caso mais pormenorizadamente, dentro dos queijos obtidos por coagulação ácida temos exemplos de queijos que não sofrem maturação, tais como o requeijão o queijo-creme e o queijo *Ricotta* que sofre tratamento térmico. A coagulação ácida é devida à descida do pH do leite ou nata para um valor que ronda 4,6, provocando a coagulação da caseína.

No caso do queijo *Ricotta* a coagulação do soro dá-se por acidificação (pH = 6,0) e aplicação de calor (80°C). A precipitação ocorre ao fim de 30 minutos e obtém-se um queijo bastante húmido, tendo assim uma curta vida de prateleira.

No caso dos queijos amadurecidos internamente por acção bacteriana destacam-se os conhecidos queijos *Parmigiano-Reggiano* (muito duro), *Cheddar* (duro), *Gouda* e *Emmental* (queijos com “olhos”), *Feta* (queijo rico em sal) e *Mozzarella (pasta-filata)*.

A textura dura do queijo *Parmigiano-Reggiano* é obtida através de cozedura a elevadas temperaturas e períodos longos de maturação, ao longo dos quais se provoca a evaporação da humidade do queijo. Este queijo é obtido através do leite de vaca, parcialmente desnatado, cozido a uma temperatura entre 53-55°C e sujeito a uma maturação de cerca de 2 anos no mínimo.

O queijo *Cheddar* é obtido através de leite pasteurizado de vaca, ao qual se adiciona cloreto de cálcio e os inóculos utilizados são *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* ou *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. Antes de se proceder à cozedura, aumenta-se a temperatura do produto de 30°C para 37-39°C e mantém-se a coalhada durante cerca de 30 minutos exposta a esta. Após este período procede-se então à cozedura a uma temperatura que ronda 37-39°C durante uma hora. Numa fase posterior altera-se o pH para 5,2 e adiciona-se cloreto de sódio numa proporção máxima de 2%. A sua maturação pode variar entre 6 meses a 2 anos e ocorre a 6-8°C.

O queijo *Gouda* é obtido por acção de microrganismos mesófilos no leite de vaca pasteurizado e após se obter a coalhada esta é agitada a 36°C com água durante 30 minutos. Após este processo ocorre a moldagem num período que dura 5 a 6 horas, a adição de sal em salmoura, ficando esta em

contacto com o produto durante 3 a 5 dias e por fim ocorre a maturação do queijo durante 2 a 3 meses a 15°C.

Apesar de se encontrar na mesma categoria que o *Gouda*, o queijo *Emmental* é obtido de uma forma diferente. O leite utilizado não é pasteurizado e o inóculo consiste em bactérias termófilas. A cozedura ocorre a 55°C e a adição de sal faz-se em seco, ou seja, em contacto com a superfície do queijo, durante 1 a 2 dias e, após este período, em salmoura durante 2 dias a 8-10°C. O queijo é armazenado primeiro num ambiente frio (10-15°C) durante cerca de duas semanas e de seguida num ambiente quente durante 3 semanas a 2 meses. Neste último armazenamento a uma temperatura que oscila entre 20-24°C, ocorre a formação dos chamados “olhos”. Após a formação destes, o queijo volta a ser armazenado num ambiente frio (7°C) durante 2 meses.

O queijo *Feta*, queijo rico em sal, é produzido a partir de leite de ovelha ou de mistura de leites de ovelha e cabra com adição de cloreto de cálcio (agente coagulante); adiciona-se sal seco e armazena-se o produto em recipientes durante uma semana e, após esta, adiciona-se ao recipiente salmoura (14-16°C); altera-se o pH para 4,5 e armazena-se o queijo durante um período superior a 2 meses a 3-4°C, antes do seu consumo.

Dentro dos chamados queijos de *pasta filata*, destaca-se o queijo *Mozzarella*. Este queijo resulta da cozedura de leite de vaca pasteurizado a 41°C, seguida da alteração do pH para 5,1-5,3. Aquece-se e estica-se o queijo a 65°C, coloca-se em moldes e arrefece-se até o queijo solidificar. Após este período adiciona-se a salmoura e procede-se à maturação, tendo esta uma duração inferior a um mês.

Os queijos amadurecidos por acção de bolores incluem os conhecidos *Camembert* e *Roquefort*.

O queijo *Camembert* é obtido a partir de leite bovino, normalmente pasteurizado. Este sofre a adição de esporos de *Penicillium camemberti*, a 30°C, e adiciona-se sal, em seco (no caso de se usar leite não pasteurizado) ou em salmoura (no caso de leite pasteurizado), promovendo a secura da superfície a 12°C durante 10-12 dias. Após esta fase desenvolve-se o bolor típico destes queijos e após o seu embalamento o queijo é armazenado a 7°C durante uma semana a uma semana e meia.

Por sua vez, o queijo *Roquefort* é obtido a partir de leite de ovelha e, após a fase de coagulação, adicionam-se esporos de *Penicillium roqueforti*. Adiciona-se o sal em seco e este permanece em contacto com o produto durante uma semana. A maturação ocorre numa sala a 5-10°C durante 3 a 5 meses e limpa-se a superfície do queijo a cada 2 a 3 semanas.

A última categoria (queijos maturados à superfície) inclui, entre outros, o queijo *Limburger*. O processo de produção deste queijo inclui a adição de bactérias mesófilas a leite de vaca pasteurizado e procede-se a cozedura desta mistura a 37°C. Após a obtenção de blocos de queijo de cerca de 1 kg de peso, adiciona-se o sal seco ou em salmoura durante 1 a 2 dias e mantém-se este durante 2 a 3 semanas a 10-15°C, procedendo-se à sua viragem frequentemente. Armazena-se o produto final durante 6 a 8 semanas a baixa temperatura e após este período tem-se o *Limburger* pronto para consumo (Fox et al., 2000).

Os vários tipos de queijo abordados encontram-se esquematizados na figura 1.2.

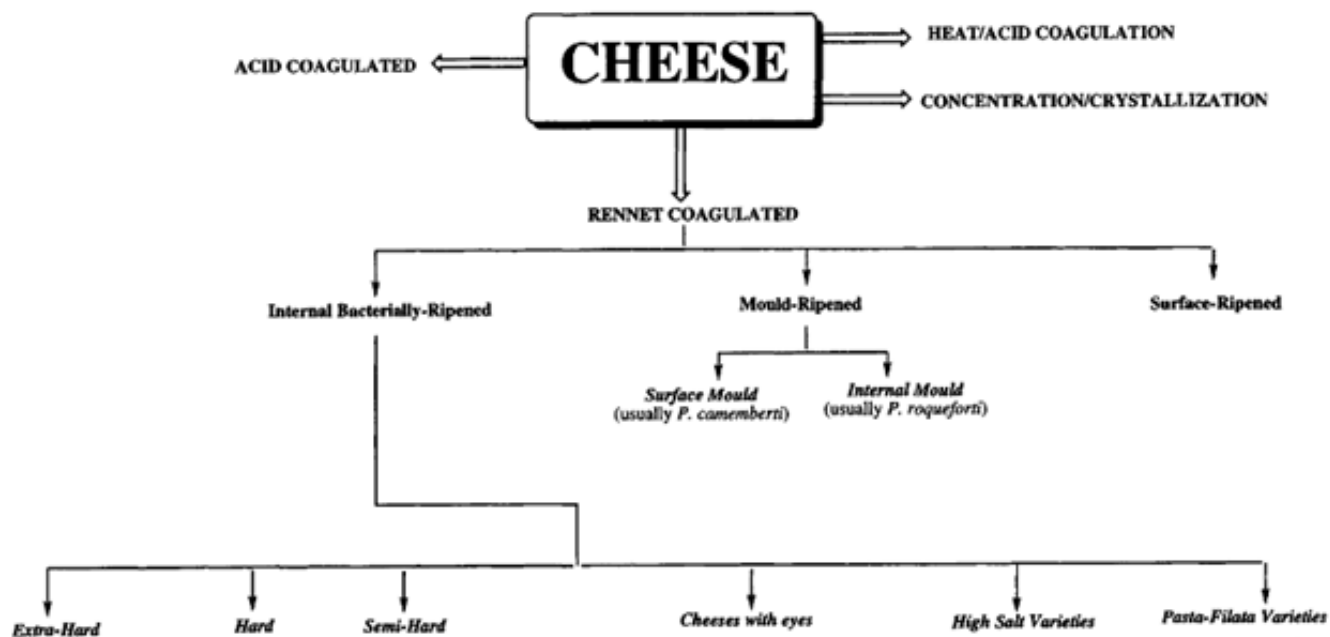


Figura 1.2: Tipos de queijo produzidos actualmente (Fox et al., 2000).

Dentro dos tipos de queijo também se pode incluir o chamado queijo processado. Este não é produzido a partir de leite mas sim a partir de outros queijos, leite desnatado, água, caseína, caseinatos e outros ingredientes lácteos, óleos vegetais, proteínas vegetais entre outros ingredientes. O queijo processado inclui também os alimentos com queijo processado e o queijo processado de barrar (Fox et al., 2000).

1.4. Variação na composição e propriedades do queijo em função do processo de produção

Existem vários factores – antes, durante ou após o processo de produção – que podem afectar as propriedades físico-químicas dos vários tipos de queijo.

1.4.1. Efeito da alimentação do animal em função da estação do ano

As pastagens disponíveis para a alimentação dos animais variam consoante a estação do ano e a região onde se situam. Assim, diferentes pastagens apresentam diferentes composições resultando em diferentes propriedades físico-químicas no leite produzido pelos animais que as consomem e, consequentemente, diferentes propriedades físico-químicas dos queijos produzidos a partir destes leites.

Chion e colaboradores estudaram as alterações nas propriedades dos queijos produzidos a partir de leites gerados por vacas que se alimentaram das pastagens disponíveis no Inverno (W) e a partir de leites produzidos por vacas que se alimentaram de pastagens disponíveis no Verão (S).

Foram determinados para ambos os tipos de queijo os ácidos gordos e os terpenos presentes em cada um.

Em relação aos ácidos gordos, verificou-se que C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C14:1 e C16:0 apresentam maior concentração no queijo W, produzido durante o Inverno. Contrariamente, os ácidos gordos de maior cadeia, nomeadamente C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 e CLA (ácido linoleico conjugado, C18:2), apresentam maior concentração no queijo produzido no Verão, S. Também se determinou, por comparação, que o queijo produzido durante o Inverno é mais rico em ácidos gordos saturados e o queijo produzido durante o Verão é mais rico em ácidos gordos insaturados (monoinsaturados e poliinsaturados).

A nível da determinação dos terpenos, esta provou que todos os terpenos identificados apresentavam em concentrações muito superiores no queijo S (de Verão) que no queijo W (de Inverno).

Este estudo teve como conclusão que a dieta dos animais influencia a composição do leite e, consequentemente, a composição do queijo produzido a partir deste. No Verão, as pastagens disponíveis concedem ao queijo uma composição mais saudável em ácidos gordos, observando-se concentrações superiores de ácidos gordos insaturados (Chion et al., 2010).

1.4.2. Efeito da congelação

Zhang e colaboradores estudaram o efeito do tempo e da temperatura de congelação em queijos produzidos a partir de leite de ovelha. Estes autores estudaram o efeito destes dois parâmetros na composição do queijo, nomeadamente no teor de matéria seca, gordura e proteínas, assim como no seu perfil de ácidos gordos.

Em relação ao tempo de congelação, analisaram-se queijos submetidos a 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 meses de congelação e verificou-se que, em relação à matéria seca, esta não se alterou muito, evoluindo de 57,28% para 60,35% ao longo dos seis meses; o mesmo se observou no caso dos teores em gordura e proteínas, variando estes de 27,19% a 28,92% e de 25,63% a 26,43%, respectivamente, ao longo dos 6 meses de congelação. Em relação à variação da temperatura, foram analisados queijos submetidos às seguintes temperaturas de congelação: -15 e -25°C.

Tal como no caso anterior, pouca variação se evidenciou nos teores de matéria gorda, gordura e proteínas para as diferentes temperaturas, tendo sido determinados os seguintes teores: 58,03% (-15°C) e 58,14% (-25°C) para o caso da matéria gorda; 27,08% (-15°C) e 27,81% (-25°C) para a gordura; 25,85% (-15°C) e 25,44 % (-25°C) para o caso das proteínas.

Em relação aos ácidos gordos, o mesmo se verificou no caso dos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e CLA: os seus teores não variaram significativamente durante o período de congelação.

Sendo assim, concluiu-se que a submissão do produto a congelação não altera a sua composição (Zhang et al., 2006_c).

1.4.3. Efeito do inóculo

Bergamini e colaboradores estudaram o efeito de diferentes inóculos nas propriedades bioquímicas de um queijo típico argentino produzido a partir de leite de ovelha. Os queijos produzidos a partir da actividade de *Streptococcus thermophilus* foram denominados queijos S e os queijos produzidos pela acção de *S. thermophilus* em conjunto com *Lactobacillus helveticus* e *L. bulgaricus* foram denominados por queijos L.

Em relação aos ácidos orgânicos, ao fim de 180 dias de maturação, estes apresentaram variações nos seus teores para ambos os queijos. O ácido láctico diminuiu com o aumento da maturação do queijo, apresentando níveis iniciais e finais superiores para o queijo L. No caso do queijo S, os ácidos cítrico, acético, pirúvico e succínico aumentaram todos com o tempo, mas no caso do queijo L, apenas os ácidos acético e succínico apresentaram este comportamento. Todos os ácidos estudados apresentaram teores iniciais superiores para o caso do queijo L, e, níveis finais inferiores para o mesmo queijo, no caso dos ácidos cítrico, acético e succínico.

Os ácidos gordos livres também foram estudados nos dois queijos, ao fim de 2 e 180 dias de maturação, nomeadamente os ácidos C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2. Todos aumentaram o seu teor ao longo do tempo para o caso do queijo S assim como o queijo L.

Comparando os teores de cada ácido para cada queijo, verificou-se que todos os ácidos quantificados apresentaram um teor inicial igual ou superior no queijo L em relação ao queijo S e um teor final superior no queijo L.

Relativamente aos compostos voláteis, estes foram determinados por classe, verificando-se que, ao se compararem os teores presentes nos queijos S e L, as cetonas e aldeídos encontravam-se em maior quantidade no queijo L e que os álcoois e ésteres no queijo S.

Em suma, a principal conclusão deste trabalho foi a de que as propriedades dos queijos são afectadas pelo inóculo utilizado na sua produção (Bergamini et al., 2010).

1.4.4. Efeito da temperatura de maturação

O efeito da temperatura de maturação na composição de queijos tipo Cheddar foi investigado por Rehman e colaboradores utilizando um tempo de maturação de seis meses a duas temperaturas diferentes: 1°C e 8°C. No final do período de maturação foram determinadas, para cada queijo, as concentrações dos ácidos gordos, ésteres etílicos, cetonas, aldeídos, álcoois e lactonas.

De entre os ácidos gordos determinados (etanóico, propanóico, butanóico, pentanóico, hexanóico, heptanóico, octanóico, nonanóico, decanóico, decenóico, undecanóico, dodecanóico, tetradecanóico, tetradecenóico, pentadecanóico, hexadecanóico e hexadecenóico), todos apresentavam maior concentração no caso do queijo maturado a 8°C que a 1°C.

Para o caso dos ésteres etílicos, etil hexanoato, etil octanoato, etil decanoato, etil dodecanoato, etil tetradecanoato e etil lactato, verificou-se a mesma situação que para os ácidos gordos.

No caso das cetonas verificaram-se duas situações distintas: ou as concentrações das cetonas eram superiores para o caso do queijo maturado a 1°C ou eram as mesmas, ou muito próximas, para os dois queijos. As cetonas detectadas incluíram a 2-hexanona, 2-heptanona, 2-octanona, 2-nonanona, 8-nonen-2-ona, 2-decanona, 2-undecanona, 2-dodecanona, 2-tridecanona e 2-pentadecanona.

Para o caso dos aldeídos, à excepção do hexanal, todos apresentaram a mesma situação verificada para o caso dos ácidos gordos e ésteres etílicos. Detectaram-se os seguintes aldeídos: hexanal, heptanal, nonanal, tetradecanal, hexadecanal, benzaldeído e fenilacetaldéido.

Os álcoois apresentaram resultados um pouco únicos – alguns exibiram maior concentração no queijo maturado a 8°C e outros no queijo maturado a 1°C. De entre os álcoois que exibiram o primeiro comportamento encontrava-se o 2-metil-propanol, o 1-butanol, o 1-hexanol, o 1-heptanol, o 1-octanol e o 2-pentanol; os álcoois com maior concentração no queijo maturado a 1°C foram o 3-metil-butanol, o álcool furfurílico, e o álcool fenetílico.

Por fim, todas as lactonas exibiram os mesmos resultados que as cetonas mas, neste caso, com uma concentração superior no queijo com temperatura de maturação de 8°C.

Com este estudo concluiu-se que a composição do queijo é alterada conforme a temperatura utilizada durante o período de maturação e, neste caso, quanto maior foi a temperatura utilizada maior a concentração dos compostos estudados, em geral (Rehman et al., 2000).

1.4.5. Efeito do tipo de embalagem

Dervisoglu e Yazici, estudaram a influência do material de embalagem nas propriedades bioquímicas, microbiológicas e sensoriais do queijo Kulek. Estes autores estudaram o efeito de embalagens de madeira e plástico neste tipo de queijo turco ao longo de um período de maturação de 90 dias, sendo o seu conteúdo analisado de 30 em 30 dias.

Relativamente às propriedades químicas, centraram-se nos parâmetros matéria seca, teor de sal na matéria seca, teor total de azoto, teor de azoto solúvel e pH, determinando que, com o tempo, todos estes parâmetros tinham tendência a aumentar. Relativamente ao tipo de embalagem utilizada, repararam que existiam maiores teores de matéria seca, azoto total, azoto solúvel e um pH mais elevado quando se utilizaram embalagens de madeira evidenciando-se a situação inversa para o caso do teor de sal na matéria seca.

Em relação às propriedades microbiológicas, de entre os microrganismos quantificados no queijo (bactérias totais, leveduras e bolores, microrganismos proteolíticos, lipolíticos e psicrotróficos), apenas os lipolíticos se apresentavam em maior número para o caso de embalagens de plástico. Também se verificou que todos estes tinham tendência a aumentar com o tempo de maturação.

Também se procedeu ao estudo de quantificação dos teores de caseína, nomeadamente α -, β -, γ_1 -, γ_2 - e γ_3 -caseína. Dervisoglu & Yazici determinaram que para o caso da α -caseína esta começava por apresentar maior teor para o caso da embalagem de plástico ao fim de 30 dias de maturação mas evidenciou-se o oposto ao fim de 60 e 90 dias de maturação, para o caso da β -caseína, esta apresentava sempre maiores teores para o caso da embalagem de plástico. No caso das γ -caseínas, a γ_1 - apresentava maior teor na embalagem de madeira ao longo dos 90 dias de maturação, a γ_2 - apresentava maior teor para o caso da embalagem de madeira ao fim de 30 dias mas a situação inversa se evidenciava ao fim de 60 e 90 dias de maturação do queijo e, a γ_3 - exibiu o mesmo caso que a γ_1 -.

Por último, dentro das propriedades sensoriais deu-se relevo à determinação do sabor, textura e aspecto e coloração do queijo Kulek. Os primeiros dois parâmetros foram considerados superiores para o queijo contido numa embalagem de madeira e, o último parâmetro foi superior na embalagem de plástico ao fim de 30 dias de maturação e superior na embalagem de madeira ao fim de 60 e 90 dias de maturação.

Com este estudo pode-se concluir que o material utilizado na embalagem do queijo apresenta influência nas suas propriedades, sendo neste caso recomendado uma embalagem de madeira para o acondicionamento deste queijo típico turco (Dervisoglu & Yazici, 2001).

1.4.6. Efeito do tipo de leite em função da espécie animal

Pappa e colaboradores estudaram a influência do tipo de leite em função da espécie animal em queijos Teleme, produzidos a partir de três leites de espécies diferentes: ovino (O), bovino (B) e caprino (C), tendo sido o processo de produção sempre o mesmo apenas variando o tipo de leite utilizado.

Ao se compararem os três queijos obtidos, comprovou-se que o pH tende a diminuir ao longo dos 180 dias a que os queijos estiveram submetidos a maturação, assim como o teor em proteína. O oposto se verificou para o caso do teor de sal e gordura.

Comparando cada parâmetro em função do tipo de leite, verificou-se que o queijo B possuía um menor pH inicial que o queijo O, que por sua vez também apresentava um pH ligeiramente mais baixo que o queijo C. A nível do pH final, este era menor para o queijo O, seguindo-se o queijo B e superior para o queijo C.

As proteínas apresentavam teores superiores para o queijo C e inferiores para o queijo B ao longo do processo de maturação. O teor de sal ostentava a situação inversa, sendo superior o seu teor inicial para o caso do queijo B e inferior para o queijo C. Contudo, o seu teor final era superior para o caso do queijo C e inferior para o queijo O. A nível do teor em gordura, o queijo que apresentava níveis superiores deste componente era o C após um dia de maturação e, ao fim de 180 dias, o queijo que exibia maior teor em gordura era o queijo O, seguido do C e por fim do B.

Com este estudo ficou provado que as propriedades finais do queijo são influenciadas pelo tipo de leite utilizado na sua fabricação e em particular depende da espécie animal que produziu o leite. Os

leites provenientes de diferentes espécies animais apresentam diferentes propriedades físico-químicas, conferindo igualmente diferentes propriedades físico-químicas aos queijos deles derivados (Pappa et al., 2006).

1.4.7. Efeito do tipo de leite em função da raça animal

O efeito da raça do animal produtor do leite nas características finais do queijo foi estudado por Hayaloglu e colaboradores que compararam as propriedades de queijos produzidos a partir do leite de cabras de duas raças diferentes. Estes cientistas deduziram que diferenças no pH, teor em matéria seca e conteúdo em proteína, gordura e cinzas entre os dois leites iriam influenciar as propriedades do queijo e, para testar a sua teoria, conduziram este estudo produzindo dois queijos com todas as etapas de produção iguais à exceção do leite usado, tendo um sido de origem de cabras *Gokceada* (G) e o outro cedido por cabras *Turkish Saanen* (TS).

Compararam a composição química dos dois queijos e evidenciaram que o queijo produzido com o leite G apresenta um maior teor de matéria seca, proteína, gordura e cinzas em relação ao queijo produzido com o leite TS, mas no caso do teor de sal, este apresenta a relação inversa que os restantes parâmetros.

Estes autores também testaram os níveis de pH, acidez titulável e azoto ao longo de 90 dias de maturação dos queijos. Em relação ao pH, este tem tendência a diminuir o seu valor, em ambos os queijos, com o decorrer da maturação, evidenciando que com o tempo o queijo tende a ficar mais ácido. O valor de pH, tanto o inicial (após um dia de maturação) como o final (após 90 dias de maturação) é superior para o caso do queijo de leite TS. A nível da acidez titulável o seu valor, como era esperado devido aos resultados do pH, aumenta com o decorrer da maturação e os seus valores são superiores para o caso do queijo de leite TS (30 e 60 dias de maturação) e para o queijo G ao fim de 1 e 90 dias de maturação, ou seja no início e no fim deste processo.

O teor em azoto praticamente não se altera com o tempo e apresenta valores superiores para o queijo TS.

Com este estudo concluiu-se que a raça do animal influencia as propriedades do queijo, uma vez que o leite providenciado apresenta propriedades diferentes conforme a raça de animal, neste caso cabra, que o produz (Hayaloglu et al., 2013).

1.5. Componentes do aroma do queijo

A aceitação de um queijo por parte dos consumidores depende essencialmente das suas propriedades organolépticas, como por exemplo, o sabor e o aroma.

Estas propriedades estão directamente relacionadas por uma combinação de compostos voláteis e não voláteis. O perfil de sabor de um queijo é dependente da presença de certos compostos, tais como compostos sulfurados, ácidos orgânicos, lactonas, álcoois, metilcetonas, entre outras substâncias (Seitz, 1990; Urbach, 1993).

Como foi descrito no processo de produção, a reacção básica no fabrico de queijo é a conversão de lactose a ácido láctico pelo inóculo. A produção do ácido láctico deriva da fermentação dos hidratos de carbono, ou mais comumente conhecidos como glícidos, a ácido pirúvico pela via das hexoses-difosfato e a consequente transformação deste em ácido láctico (Adda et al., 1982).

Uma grande variedade de compostos, entre os quais ácidos voláteis, aldeídos, cetonas e álcoois são acumulados no queijo durante o período de maturação. As substâncias que se desenvolvem durante este período dependem da complexidade bioquímica do queijo e das reacções que ocorrem ao longo do envelhecimento do queijo (Califano & Bevilacqua, 2000).

Para além destes compostos já mencionados, os ácidos gordos são igualmente essenciais no desenvolvimento de sabor e aroma no queijo e diferenças na sua proporção são responsáveis pelos aromas e sabores característicos dos diferentes tipos de queijo, diferenciando-os entre si (Green & Manning, 1982; Singh & Kristoffersen, 1970). Neste contexto, uma das reacções mais destacadas durante a maturação do queijo é a lipólise.

A lipólise ocorre devido à acção de enzimas lipolíticas (hidrolases) que quebram ligações entre os ácidos gordos e o glicerol, produzindo-se ácidos gordos livres assim como mono e diacilglicéridos (Deeth & Touch, 2000). As lípases presentes no queijo que participam no processo lipolítico podem ser do leite, do coalho, dos microrganismos inoculados no início do processo de produção de queijo, usualmente conhecidos como *starter culture*, ou dos microrganismos adicionados durante o processo de produção numa fase posterior à inicial (Collins et al., 2003).

Dos ácidos gordos libertados pela lipólise os que contribuem directamente para as características sensoriais do queijo são os de cadeia curta e média. Tanto estes, como os restantes, são igualmente precursores de outros compostos responsáveis pelo aroma e sabor do queijo tais como lactonas, metilcetonas, ésteres, alcanos e álcoois secundários (Fox & Wallace, 1997; Gripon et al., 1991; McSweeney & Sousa, 2000).

Relativamente às lactonas, estas são compostos cíclicos (Fox et al., 1993) formados por β -oxidação (Molimard & Spinnler, 1996) e, as formas α - e β - são instáveis no queijo devido a serem altamente reactivas, predominando as formas γ - e δ - que são estáveis neste produto alimentar (Eriksen, 1976).

A formação de metilcetonas decorre da β -oxidação dos ácidos gordos e a sua taxa de formação é afectada pela temperatura, pH e concentração de ácidos gordos livres (Collins et al., 2003). A redução enzimática destes compostos aromáticos resulta na formação de álcoois secundários (Engels et al., 1997).

Os ésteres existem em grande diversidade no queijo (Molimard & Spinnler, 1996), são ricos em sabor e resultam da reacção de ácidos gordos livres, de cadeia curta a média, com álcoois derivados da fermentação da lactose ou do catabolismo de aminoácidos (Yoshioka & Hashimoto, 1983).

Para além da lipólise, existem outras reacções que ocorrem durante a maturação e que são responsáveis pelas alterações dos níveis de ácidos gordos e orgânicos. Destacam-se reacções específicas das culturas utilizadas – inóculo – que por exemplo podem provocar a conversão de ácido acético em ácido propiónico (Grazier et al., 1993).

Alguns exemplos de compostos aromáticos evidenciados em diferentes tipos de queijos encontram-se detalhados nas tabelas 1.1 a 1.7.

Tabela 1.1: Ácidos orgânicos, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Buffa et al., 2004; 2: Califano & Bevilacqua, 2000; 3: Park & Drake, 2005; 4: Ong & Shah, 2009; 5: Manolaki et al., 2006; 6: Califano & Bevilacqua, 1999.

Ácido orgânico	Concentração (mg/kg)	Período de Maturação (dias)	Tipo de Queijo	Referência
Acético	9,5 – 59,3	60	Queijo de cabra	1
	900 – 2400	80	Queijo Gouda	2
	3150 – 4340	28	Queijo de cabra	3
	800 – 1800	168	Queijo Cheddar	4
	330 – 644	60	Queijo Feta	5
Butírico	45,0 – 61,1	60	Queijo de cabra	1
	1020 – 1340	28	Queijo de cabra	3
	800 – 1400	168	Queijo Cheddar	4
	18,3 – 136,0	60	Queijo Feta	5
Cítrico	37,2 – 28,0	60	Queijo de cabra	1
	400 – 3500	80	Queijo Gouda	2
	710 – 870	28	Queijo de cabra	3
	2300 – 1600	168	Queijo Cheddar	4
	1009 – 408	60	Queijo Feta	5
	2500 – 3000	40	Queijo Mozzarella	6

Tabela 1.1 (continuação)

Fórmico	3,6 – 8,9	60	Queijo de cabra	1
	490 – 1200	80	Queijo Gouda	2
	2220 – 2210	28	Queijo de cabra	3
	1400 – 1900	40	Queijo Mozzarella	6
Láctico	303,4 – 315,7	60	Queijo de cabra	1
	18000 – 30000	80	Queijo Gouda	2
	10190 – 10370	28	Queijo de cabra	3
	12000 – 16000	168	Queijo Cheddar	4
	13462 – 16487	60	Queijo Feta	5
	11000 – 13000	40	Queijo Mozzarella	6
Málico	2,6 – 39,6	60	Queijo de cabra	1
	1180 – 1440	28	Queijo de cabra	3
Orótico	40 – 10	28	Queijo de cabra	3
	36,50 – 8,49	60	Queijo Feta	5
	4	40	Queijo Mozzarella	6
Pirúvico	0,5 – 2,6	60	Queijo de cabra	1
	110 – 260	80	Queijo Gouda	2
	143,0 – 10,4	60	Queijo Feta	5
Propiónico	10,2 – 87,1	60	Queijo de cabra	1
	200 – 4000	80	Queijo Gouda	2
	690 – 640	28	Queijo de cabra	3
	34 – 152	60	Queijo Feta	5
Succínico	36,0 – 15,6	60	Queijo Feta	5
Tartárico	930	28	Queijo de cabra	3
Úrico	0,5 – 0,0	60	Queijo de cabra	1
	0 – 10	28	Queijo de cabra	3
	17,60 – 2,87	60	Queijo Feta	5
	7 – 14	40	Queijo Mozzarella	6

Tabela 1.2: Ácidos gordos, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Akin et al., 2003; 2: Partidário et al., 1998; 3: Kondyli et al., 2013; 4: Mallatou et al., 2003; 5: Bontinis et al., 2012; 6: Delgado et al., 2011.

Ácido gordo	Concentração (mg/kg)	Período de Maturação (dias)	Tipo de Queijo	Referência
C3:0	2 – 7	30	Queijo Branco em conserva	1
C4:0	6 – 18	30	Queijo Branco em conserva	1
	20 – 37	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	18,58 – 19,21	30	Queijo Galotyri	3
	0 – 43	180	Queijo Teleme	4
	71,0 – 286,3	180	Queijo Xinotyri	5
	787,3 – 1251,6	90	Queijo de cabra	6
C5:0	6 – 19	30	Queijo Branco em conserva	1
C6:0	2 – 13	30	Queijo Branco em conserva	1
	25,5 – 34,2	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	25,56 – 26,60	30	Queijo Galotyri	3
	0 – 38	180	Queijo Teleme	4
	75,4 – 398,3	180	Queijo Xinotyri	5
	128,3 – 242,2	90	Queijo de cabra	6
C8:0	4 – 13	30	Queijo Branco em conserva	1
	24,7 – 33,3	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	28,48 – 31,38	30	Queijo Galotyri	3
	60 – 56	180	Queijo Teleme	4
	90,7 – 763,7	180	Queijo Xinotyri	5
	50,5 – 260,0	90	Queijo de cabra	6
C10:0	6 – 14	30	Queijo Branco em conserva	1
	63,3 – 88,9	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	23,37 – 30,85	30	Queijo Galotyri	3
	35 – 70	180	Queijo Teleme	4
	113,3 – 1228,6	180	Queijo Xinotyri	5
	127,2 – 594,5	90	Queijo de cabra	6
C10:1	1,9 – 2,9	42	Queijo da Serra da Estrela	2
C11:0	1,0 – 1,1	42	Queijo da Serra da Estrela	2

Tabela 1.2 (continuação)

C12:0	4 – 17	30	Queijo Branco em conserva	1
	35,2 – 46,4	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	87,90 – 171,06	30	Queijo Galotyri	3
	50 – 61	180	Queijo Teleme	4
	83 – 643	180	Queijo Xinotyri	5
	90,0 – 242,3	90	Queijo de cabra	6
C12:1	1 – 0	42	Queijo da Serra da Estrela	2
C13:0	1	42	Queijo da Serra da Estrela	2
C14:0	5 – 11	30	Queijo Branco em conserva	1
	67,1 – 97,7	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	41,06 – 45,49	30	Queijo Galotyri	3
	25 – 68	180	Queijo Teleme	4
	161,7 – 1854,8	180	Queijo Xinotyri	5
	144,8 – 430,5	90	Queijo de cabra	6
C14:1	1,3 – 1,9	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	22,60 – 25,36	30	Queijo Galotyri	3
C15:0	6,9 – 10,7	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	85,0 – 96,8	90	Queijo de cabra	6
C16:0	7 – 18	30	Queijo Branco em conserva	1
	124 – 198	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	55,74 – 91,54	30	Queijo Galotyri	3
	98 – 213	180	Queijo Teleme	4
	363,0 – 4357,7	180	Queijo Xinotyri	5
	454,0 – 1241,3	90	Queijo de cabra	6
C16:1	5,8 – 9,8	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	22,50 – 26,05	30	Queijo Galotyri	3
C17:0	2,6 – 4,9	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	0,0 – 150,1	90	Queijo de cabra	6
C17:1	1,9 – 3,9	42	Queijo da Serra da Estrela	2
C18:0	107 – 123	30	Queijo Branco em conserva	1
	62,4 – 106,0	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	29,51 – 46,21	30	Queijo Galotyri	3
	75 – 101	180	Queijo Teleme	4
	219,8 – 1591,0	180	Queijo Xinotyri	5
	279,1 – 767,8	90	Queijo de cabra	6

Tabela 1.2 (continuação)

C18:1	129 – 276	30	Queijo Branco em conserva	1
	130 – 220	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	39,45 – 60,19	30	Queijo Galotyri	3
	66 – 123	180	Queijo Teleme	4
	676,5 – 7256,0	180	Queijo Xinotyri	5
	479,4 – 2500,0	90	Queijo de cabra	6
C18:2	6,7 – 12,4	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	27,43 – 33,87	30	Queijo Galotyri	3
	0 – 70	180	Queijo Teleme	4
	138,8 – 1088,3	180	Queijo Xinotyri	5
	125,3 – 227,3	90	Queijo de cabra	6
C18:3	4,9 – 6,6	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	24,67 – 31,30	30	Queijo Galotyri	3
	114 – 588	180	Queijo Xinotyri	5
C20:0	1,0 – 1,4	42	Queijo da Serra da Estrela	2
	24,41 – 34,14	30	Queijo Galotyri	3

Tabela 1.3: Álcoois, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Delgado et al., 2011; 2: Bontinis et al., 2012; 3: Ziino et al., 2005; 4: Kondyli et al., 2013.

Composto	Concentração (UA)	Tempo de Maturação (dias)	Tipo de Queijo	Referência
1-butanol	$(0,0 - 7,7) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	18 – 238	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
	1,91 – 3,64	30	Queijo Galotyri	4
3-metilbutanol	$(37,5 - 22,5) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	1,26 – 2,56	30	Queijo Galotyri	4
, 4-butoxibutanol	$(3,2 - 0,0) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
1-dodecanol	9,00 – 6,02	180	Queijo Xinotyri	2
1-hexadecanol	0,64 – 2,05	180	Queijo Xinotyri	2
1-hexanol	62 – 175	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
	1,93 – 3,70	30	Queijo Galotyri	4
1-octanol	8,64 – 4,15	180	Queijo Xinotyri	2
	0,00 – 1,96	30	Queijo Galotyri	4

Tabela 1.3 (continuação)

1-pentanol	$(1,6 - 0,4) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	0,88 – 2,04	30	Queijo Galotyri	4
3-metilpentanol	1,85 – 2,03	30	Queijo Galotyri	4
1-propanol	$(0,0 - 5,2) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
1,6-heptadieno-4-ol	0,00 – 0,34	180	Queijo Xinotyri	2
1,4-pentadieno-3-ol	0,00 – 1,05	180	Queijo Xinotyri	2
2-butanol	$(109,7 - 602,4) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
2-etildecanol	0,00 – 0,13	180	Queijo Xinotyri	2
2-etilhexanol	158 – 94	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
2-furanmetanol	$(0,0 - 0,4) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	0,00 – 0,08	180	Queijo Xinotyri	2
2-heptanol	$(2,4 - 84,3) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
2-metil-1-butanol	16,81 – 3,83	180	Queijo Xinotyri	2
2-metil-1-pentanol	0,87 – 0,09	180	Queijo Xinotyri	2
2-metil-1-penten-1-ol	0,58 – 0,09	180	Queijo Xinotyri	2
2-metil-3-octeno-2-ol	1,26 – 0,46	180	Queijo Xinotyri	2
2-nonanol	$(0,0 - 13,1) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	8 – 83	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
2-noneno-1-ol	$(8,4 - 1,8) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
2-pentanol	$(0,0 - 27,2) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	0,73 – 1,32	30	Queijo Galotyri	4
2-propanol	$(0,6 - 1,6) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
2,3-butanediol	0,86 – 2,37	30	Queijo Galotyri	4
2,3-hexanediol	0,00 – 3,71	180	Queijo Xinotyri	2
2,4-hexadieno-1-ol	$(0,0 - 4,6) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
2,4-metil-3-pentanol	1,25 – 0,60	180	Queijo Xinotyri	2
2,6-dimetil-3-heptanol	2,12 – 8,48	180	Queijo Xinotyri	2
3-metil-3-buten-1-ol,	$(2,7 - 1,3) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
3-etilfenol	0,11 – 0,20	180	Queijo Xinotyri	2
3-metil-1-hexanol	3,23 – 3,39	180	Queijo Xinotyri	2
3-metil-3-pentanol	3,95 – 17,73	180	Queijo Xinotyri	2
3-penteno-2-ol	$(5,7 - 2,0) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
4-decanol	0,00 – 0,89	180	Queijo Xinotyri	2
4-heptanol	0,07 – 1,78	180	Queijo Xinotyri	2

Tabela 1.3 (continuação)

4-nonanol	1,21 – 0,71	180	Queijo Xinotyri	2
4,5-octanediol	0,30 – 3,04	180	Queijo Xinotyri	2
6-metil-1-heptanol	0,00 – 0,36	180	Queijo Xinotyri	2
2-Metilciclohexanol,	$(7,5 - 4,7) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
álcool benzílico	0,00 – 1,25	180	Queijo Xinotyri	2
álcool feniletílico	0,45 – 2,94	180	Queijo Xinotyri	2
ciclohexanol	0,19 – 1,54	180	Queijo Xinotyri	2
etanol	88,25 – 68,12	180	Queijo Xinotyri	2
	179,76 – 330,93	30	Queijo Galotyri	4
2-metoxi-etanol	$(12,9 - 40,8) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1

Tabela 1.4: Ésteres, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Delgado et al., 2011; 2: Bontinis et al., 2012; 3: Ziino et al., 2005.

Composto	Concentração (UA)	Tempo de Maturação (dias)	Tipo de Queijo	Referência
acetato de etilo	$(5,1 - 6,6) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	51 – 82	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
acetato de 2-feniletilo	4,04 – 0,66	180	Queijo Xinotyri	2
acetato de propilo	$(0 - 1) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
2,2-dimetilbutanoato de metilo	0,32 – 1,25	180	Queijo Xinotyri	2
2-hidroxi-3-metil-butanoato de metilo	0,00 – 0,25	180	Queijo Xinotyri	2
2-metilbutanoato de metilo	0,36 – 0,25	180	Queijo Xinotyri	2
butanoato de butilo	$(0 - 41) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	0,05 – 0,47	180	Queijo Xinotyri	2
	47 – 146	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
butanoato de etilo	$(62,6 - 76,9) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	3,63 – 2,16	180	Queijo Xinotyri	2
	782 – 825	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
butanoato de propilo	$(0,0 - 13,5) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	76 – 204	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3

Tabela 1.4 (continuação)

decanoato de etilo	$(8,9 - 47,2) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	0,15 – 22,08	180	Queijo Xinotyri	2
	665 – 1334	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
decanoato de metilo	0,0 – 1,4	180	Queijo Xinotyri	2
	24 – 47	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
decanoato de propilo	26 – 143	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
dodecanoato de etilo	4,09 – 1,03	180	Queijo Xinotyri	2
hexanoato de butilo	$(0,0 - 77,2) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	11,43 – 7,56	180	Queijo Xinotyri	2
	13 – 243	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
hexanoato de etilo	$(42,0 - 173,7) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	36,75 – 87,29	180	Queijo Xinotyri	2
	1965 – 2496	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
hexanoato de metilo	0,0 – 1,8	180	Queijo Xinotyri	2
hexanoato de propilo	48 – 646	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
4-hexenoato de etilo	$(0,0 - 3,5) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
heptanoato de metilo	0,57 – 0,40	180	Queijo Xinotyri	2
octanoato de butilo	18 – 101	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
octanoato de etilo	$24,1 - 54,2) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	654 – 1785	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
octanoato de metilo	$(4,8 - 0,7) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
	0,00 – 4,99	180	Queijo Xinotyri	2
octanoato de propilo	17 – 378	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
2-metilpropanoato de metilo	0,00 – 1,11	180	Queijo Xinotyri	2
2-metil-3-metil-propanoato de butilo	$(0,2 - 2,8) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
2-metilpropanoato de etilo	$(0,0 - 0,8) \times 10^4$	90	Queijo de cabra	1
propanoato de etilo	26 – 40	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
tetradecanoato de etilo	26 – 70	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3

Tabela 1.5: Cetonas, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Delgado et al., 2011; 2: Bontinis et al., 2012; 3: Ziino et al., 2005; 4: Kondyli et al., 2013.

Composto	Concentração (UA)	Tempo de Maturação (dias)	Tipo de Queijo	Ref ^a
2-butanona	(0,3 – 74,5) x10 ⁴	90	Queijo de cabra	1
	3,00 – 12,22	180	Queijo Xinotyri	2
	35 – 44	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
2-heptanona	(32,8 – 30,9) x10 ⁴	90	Queijo de cabra	1
	215 – 129	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
2-hexanona	7,31 – 1,37	30	Queijo Galotyri	4
2-nonanona	(24,4 – 29,1) x10 ⁴	90	Queijo de cabra	1
	311 – 485	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
2-octanona	(0,0 – 0,4) x10 ⁴	90	Queijo de cabra	1
2-pentadecanona	12 – 30	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
2-pentanona	(13,0 – 6,3) x10 ⁴	90	Queijo de cabra	1
	0,00 – 1,56	180	Queijo Xinotyri	2
	6 – 12	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
	1,84 – 3,54	30	Queijo Galotyri	4
2-undecanona	(0,0 – 2,9) x10 ⁴	90	Queijo de cabra	1
	86 – 241	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
2,5-dimetil-3-hexanona	0,00 – 1,55	180	Queijo Xinotyri	2
3-butenona	0,12 – 1,30	180	Queijo Xinotyri	2
3-hidroxi-2-butanona	8,18 – 0,44	180	Queijo Xinotyri	2
	0,70 – 3,64	30	Queijo Galotyri	4
3-metil-2-hexanona	0,88 – 4,42	180	Queijo Xinotyri	2
3-octadecanona	0,0 – 0,4	180	Queijo Xinotyri	2
3-octanona	0,30 – 0,34	180	Queijo Xinotyri	2
3,5-octadieno-2-ona	1,62 – 0,80	180	Queijo Xinotyri	2
	109 – 54	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
4-heptanona	0,99 – 32,81	180	Queijo Xinotyri	2
4-octeno-3-ona	0,00 – 21,07	180	Queijo Xinotyri	2
5-hidroxi-2-pentanona	0,31 – 1,27	180	Queijo Xinotyri	2
6-dodecanona	3,05 – 5,10	180	Queijo Xinotyri	2
6-metil-3-heptanona	0,20 – 0,23	180	Queijo Xinotyri	2

Tabela 1.5 (continuação)

Acetona	1 – 61	90	Queijo Provola dei Nebrodi	3
	20,51 – 8,28	30	Queijo Galotyri	4

Tabela 1.6: Aldeídos, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Bontinis et al., 2012; 2: Ziino et al., 2005; 3: Kondyli et al., 2013.

Composto	Concentração (UA)	Tempo de Maturação (dias)	Tipo de Queijo	Referência
Diacetilo	4,50 – 2,05	180	Queijo Xinotyri	1
2-butenal	12,51 – 0,09	180	Queijo Xinotyri	1
2-decenal	222 – 34	90	Queijo Provola dei Nebrodi	2
2-etil heptanal	251 – 4	90	Queijo Provola dei Nebrodi	2
2-etil hexanal	0,35 – 0,24	180	Queijo Xinotyri	1
	360 – 46	90	Queijo Provola dei Nebrodi	2
2-metil butanal	6,2 – 0,39	180	Queijo Xinotyri	1
	0,62 – 2,05	30	Queijo Galotyri	3
2-metil propanal	0,00 – 1,87	180	Queijo Xinotyri	1
2-nonenal	2,45 – 0,00	180	Queijo Xinotyri	1
	309 – 77	90	Queijo Provola dei Nebrodi	2
2-undecenal	65 – 33	90	Queijo Provola dei Nebrodi	2
2,4-octadienal	0,67 – 2,72	180	Queijo Xinotyri	1
3-hidroxi butanal	0,00 – 0,15	180	Queijo Xinotyri	1
	0,77 – 1,88	30	Queijo Galotyri	3
3-metil butanal	4,49 – 0,64	30	Queijo Galotyri	3
3-metil hexanal	0,21 – 0,00	180	Queijo Xinotyri	1
4-metil-3-pentanal	0,6 – 0,79	180	Queijo Xinotyri	1
4-octadecanal	0,0 – 1,8	180	Queijo Xinotyri	1
Acetaldeído	4,21 – 0,09	180	Queijo Xinotyri	1
	2,79 – 9,49	30	Queijo Galotyri	3
Benzaldeído	1,45 – 1,61	180	Queijo Xinotyri	1
Butanal	1,46 – 2,36	30	Queijo Galotyri	3
Decanal	1,00 – 5,77	180	Queijo Xinotyri	1
Glutaral	1,82 – 0,76	30	Queijo Galotyri	3
Heptanal	3,34 – 0,45	180	Queijo Xinotyri	1
	729 – 1	90	Queijo Provola dei Nebrodi	2
	1,53 – 3,07	30	Queijo Galotyri	3

Tabela 1.6 (continuação)

Hexanal	1373 – 75	90	Queijo Provola dei Nebrodi	2
	2,32 – 5,30	30	Queijo Galotyri	3
Nonanal	0,33 – 1,00	180	Queijo Xinotyri	1
	482 – 187	90	Queijo Provola dei Nebrodi	2
Octanal	0,00 – 0,41	180	Queijo Xinotyri	1
	363 – 47	90	Queijo Provola dei Nebrodi	2
	0,99 – 1,13	30	Queijo Galotyri	3
Pentanal	0,69 – 2,62	30	Queijo Galotyri	3
Propanal	0,00 – 1,37	30	Queijo Galotyri	3

Tabela 1.7: Compostos voláteis, e sua concentração, presentes em vários tipos de queijo. 1: Ziino et al., 2005; 2: Kondyli et al., 2013.

Composto	Concentração (UA)	Tempo de Maturação (dias)	Tipo de Queijo	Ref ^a
Dissulfureto dimetílico	1,16 – 0,42	180	Queijo Xinotyri	1
Sulfureto dimetílico	0,82 – 2,85	180	Queijo Xinotyri	1
Trissulfureto dimetílico	0,81 – 0,18	180	Queijo Xinotyri	1
2,3-dihidro-furano	0,91 – 0,52	180	Queijo Xinotyri	1
2,3-dihidro-5-metil-furano	0,18 – 1,07	180	Queijo Xinotyri	1
5-metil-furano	0,0 – 0,1	180	Queijo Xinotyri	1
Tetrahidro furano	0,22 – 0,96	180	Queijo Xinotyri	1
δ -decalactona	67 – 98	90	Queijo Provola dei Nebrodi	2
δ -dodecalactona	0,18 – 2,19	180	Queijo Xinotyri	1
	47 – 53	90	Queijo Provola dei Nebrodi	2
γ -dodecanolactona	0,24 – 1,71	180	Queijo Xinotyri	1
δ -nonalactona	0,19 – 1,44	180	Queijo Xinotyri	1
δ -octalactona	1,53 – 1,95	180	Queijo Xinotyri	1
α -felandreno	0,52 – 0,35	180	Queijo Xinotyri	1
α -pineno	0,60 – 3,87	180	Queijo Xinotyri	1
β -mirceno	1,16 – 0,14	180	Queijo Xinotyri	1
β -pineno	0,29 – 0,47	180	Queijo Xinotyri	1
Cariofileno	2,18 – 3,84	180	Queijo Xinotyri	1

1.6. Técnicas analíticas utilizadas na caracterização do aroma de queijo

Algumas das técnicas utilizadas na determinação e quantificação dos compostos aromáticos do queijo por vários autores e estudos encontram-se em suma na tabela 1.8.

Tabela 1.8: Técnicas utilizadas para a análise dos diferentes compostos do aroma de diferentes tipos de queijo.

Classe	Tipo de Queijo	Técnica	Referência
Ácidos orgânicos	Queijo Gouda	HPLC-UV-Vis	Califano & Bevilacqua, 2000
	Queijo Monterey Jack	HPLC-UV-Vis	Park & Lee, 2006
	Queijo de cabra	HPLC-IE	Buffa et al., 2004
	Queijo Feta	HPLC-UV-Vis	Manolaki et al., 2006
	Queijo Mozzarella	HPLC-UV-Vis	Califano & Bevilacqua, 1999
Ácidos gordos	Queijos Gouda e Emmental	GC-MS	Dirinck & De Winne, 1999
	Queijo da Serra da Estrela	GC-MS	Tavaria et al., 2006
	Queijo semi-duro italiano	GC-MS	Berard et al., 2007
	Queijo semi-duro italiano	GC-FID	Chion et al., 2010
	Queijo duro italiano	HPLC-FD	Mangia et al., 2008
Compostos voláteis	Queijos Gouda e Emmental	GC-MS	Dirinck & De Winne, 1999
	Queijo Feta	GC-MS	Kondyli et al, 2002
	Queijo semi-duro italiano	GC-MS	Berard et al., 2007
	Queijo de cabra	GC-MS	Delgado et al., 2011
	Queijo Xinotyri	GC-MS	Bontinis et al., 2012

Neste trabalho pretende-se determinar os ácidos gordos totais presentes em amostras de queijo da ilha do Pico com diferentes tempos de maturação, optando-se para este fim o recurso a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

1.6.1. GC-MS

Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, mais comumente conhecida por GC-MS do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*, é muito utilizada nos dias de hoje em diversas áreas, tais como análises ambientais, forensicas, de resíduos e, incluindo alimentares.

É uma técnica de detecção universal, que apresenta as vantagens de possuir uma elevada selectividade e sensibilidade (Hübschmann, 2009).

Como foi referido, GC-MS combina as técnicas de cromatografia gasosa e espectroscopia de massa. A cromatografia gasosa é técnica analítica na qual um composto ou uma mistura são injectados numa corrente de gás inerte e deslocados até uma coluna revestida. A interacção entre os compostos na fase gasosa e o revestimento resulta numa separação diferencial dos componentes da mistura, sendo estes detectados em separado num detector. A identificação dos componentes da mistura pelo detector é feita através do tempo de retenção destes na coluna, o que pode resultar em perda de eficiência uma vez que certos componentes podem apresentar o mesmo tempo de retenção (McMaster, 2008).

O espectrómetro de massa ioniza a mistura injectada e concentra os iões assim como os seus produtos de fragmentação através de um analisador de massa magnético. Através de um detector, estes iões são colectados e quantificados.

A combinação destas duas técnicas permite a separação de uma mistura nos seus componentes individuais, a sua identificação e quantificação, mas apresenta igualmente algumas desvantagens como o facto de requerer compostos voláteis e apresentar limitações relativas ao peso molecular destes (McMaster, 2008).

Um aparelho de GC-MS é composto essencialmente por um cromatógrafo gasoso e um espectrómetro de massa. O cromatógrafo gasoso compreende um injetor que pode ser manual ou automático, um forno que aquece a coluna, uma coluna geralmente capilar e onde circula um gás de arrastamento, normalmente azoto, hélio ou hidrogénio que arrasta a mistura a analisar através da coluna. O espectrómetro de massa é composto por uma fonte de ionização, lentes de focalização, analisador de massa, um detector de iões e uma bomba e, o aparelho GC-MS deve possuir igualmente um sistema que processe os dados. Os componentes encontram-se esquematizados na figura 1.3.

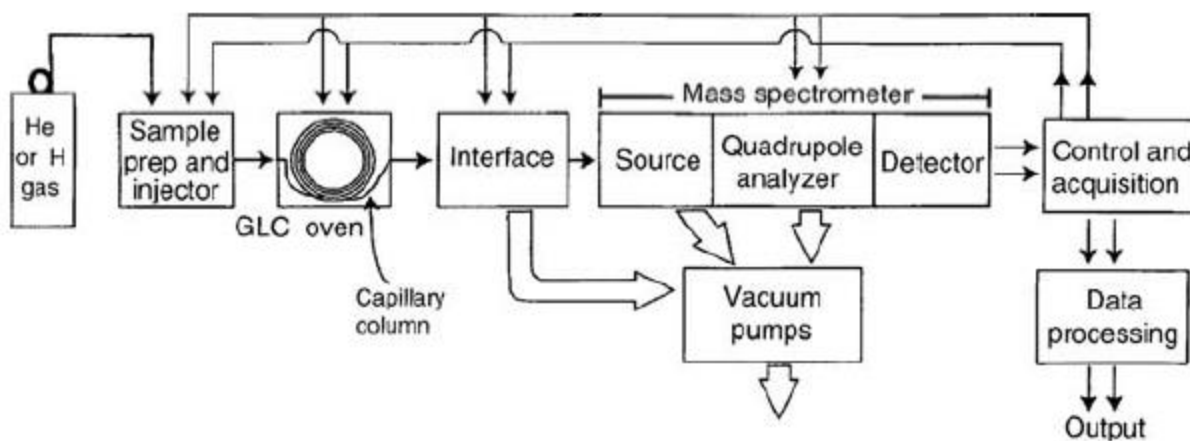


Figura 1.3: Esquematização dos componentes de um aparelho de GC-MS (McMaster, 2008).

Como já foi referido, a grande limitação desta técnica laboratorial é o facto de apenas se poderem analisar amostras voláteis.

Quando não estamos perante estes casos, uma boa forma de se resolver esta situação consiste na derivatização da amostra que queremos analisar. A derivatização consiste na modificação química da molécula do analito de forma a minimizar a possibilidade de ocorrerem interacções fortes no estado líquido nomeadamente a formação de pontes de hidrogénio ou outras interacções polares fortes, que contribuem para reduzir a volatilidade da amostra. Após efectuar a extracção dos compostos que queremos analisar de uma fase aquosa para uma fase orgânica, a derivatização consiste numa reacção entre os grupos polares como os grupos OH, NH ou SH e o agente derivatizante que vai geralmente substituir os hidrogénios desses grupos por grupos alquila não polares e ligados de forma estável por ligações covalentes (McMaster, 2008).

2. Materiais e Métodos

Este trabalho consistiu na determinação e quantificação dos ácidos gordos totais de amostras de queijo de S. João da ilha do Pico e foi realizado no Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa (DCTB) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

As amostras utilizadas para determinação do perfil de ácidos gordos deste queijo foram obtidas a partir de queijos de dois lotes diferentes – lotes A e B – com diferentes períodos de maturação, nomeadamente, 8, 17, 28 e 40 dias.

Estes queijos foram preparados recolhidos pela Doutora Catarina Pires Soares no âmbito da sua tese de doutoramento e foram mantidos congelados a -20°C desde a data de colheita tendo sido disponibilizados para este trabalho pela Professora Doutora Ana Luísa Fernando.

2.1. Fabrico do queijo

Os queijos utilizados neste trabalho foram produzidos na Queijaria do Pico (Sociedade de Produção de Lacticínios de São João) na 4.^a semana de Agosto e na 4.^a semana de Setembro de 2012. Todos os queijos foram obtidos a partir de leite bovino inteiro pasteurizado, sendo que a sua composição química pode variar devido às diferentes épocas sazonais em que foi produzido (Soares, 2013).

O leite foi arrefecido a 29°C, após pasteurização (mínimo 74,5°C, 15 segundos), tendo sido de imediato adicionados os fermentos lácteos mesófilos e solução aquosa de cloreto de cálcio no contentor fechado do veículo destinado ao transporte do leite até à queijaria de São João. Após cerca de 20 minutos de maturação do leite, foi adicionada quimosina de acordo com indicações do fabricante, para 500 L de leite trabalhado, e procedeu-se à sua agitação por 1 minuto.

A coagulação do leite prolongou-se por cerca de 30 minutos, e a coalhada foi cortada com liras manuais, deixando-se em repouso por 15 minutos a 29-30°C, voltando-se a agitar posteriormente. O dessoramento foi feito por abertura da torneira situada na base da cuba de coagulação e por transferência da coalhada para a francela, por recurso a baldes, onde o soro escoou por um orifício situado na inclinação inferior da mesma para a tina de retenção. Depois do esgotamento manual do soro, seguiu-se a etapa da salga, com adição directa de sal seco aos grãos da coalhada, tendo sido utilizados 48 g de NaCl para cada queijo.

Seguiram-se as etapas do encinchamento, para que os queijos adquirissem a forma e dimensão específicas, da prensagem, em prensa pneumática com uma única inversão dos queijos nos cinchos, e o banho dos queijos em solução diluída de natamicina. Em seguida, os queijos seguiram para as câmaras de cura reguladas a 9-11°C e 80-83% de humidade. A viragem dos queijos foi efetuada diariamente nos primeiros 8 dias de cura e depois, regularmente, de 2 em 2 dias.

As amostras foram colhidas aos 8, 17, 28 e 40 dias de maturação (Soares, 2013).

2.2. Determinação do teor em proteínas, cinzas e humidade

A determinação do teor em proteínas, cinzas e humidade foi efectuada pela Doutora Catarina Pires Soares nas mesmas amostras pelo que se optou por citar estes resultados comparando-os com os obtidos neste trabalho (Soares, 2013). No entanto transcreve-se uma descrição sumária dos métodos utilizados.

O teor de humidade foi determinado pelo método gravimétrico (AOAC, 1990, método 948.12), sendo os resultados expressos em % (m/m), relativamente à amostra húmida.

O teor de cinza determinou-se pelo método gravimétrico (AOAC, 1990, método 935.42) e os resultados foram expressos em % (m/m), numa base seca.

A proteína bruta foi determinada por quantificação do azoto total e convertendo este valor em proteína bruta através da multiplicação da percentagem de azoto total pelo factor de conversão 6,38, conforme disposto na IDF 25:2008 e considerando que a totalidade do azoto está na forma proteica. Os resultados foram expressos em % (m/m).

Por sua vez o azoto total foi determinado pelo método Kjeldahl (IDF 25:2008).

2.3. Extracção da gordura bruta

A extracção da gordura bruta (EGB) das amostras de queijo foi realizada com base no método de De Jong & Badings, (1990). Pesaram-se cerca de 2 g de amostra de queijo numa balança Mettler Toledo AB204-S, adicionaram-se cerca de 6 g de sulfato de sódio anidro e macerou-se a mistura num almofariz. Transferiu-se o conteúdo para um vial de 50 mL e adicionaram-se 0,6 mL de ácido sulfúrico 2N. Procedeu-se à extracção do extracto de gordura bruta pela adição de 10 mL de éter-hexano (1:1, v/v) por agitação durante 20 minutos numa placa de agitação Asincro Selecta. Recolheu-se o sobrenadante para outro vial de 50 mL e procedeu-se a mais duas extracções com 10 mL da mistura de éter-hexano (1:1, v/v) cada, durante 20 minutos sob agitação; recolheram-se os sobrenadantes das extracções sucessivas para o mesmo vial e adicionou-se sulfato de sódio anidro. O vial foi envolvido em papel de alumínio e armazenou-se a -20°C até a posterior utilização. Cada extracção foi realizada em duplicado.

2.4. Determinação do teor de gordura

O teor de gordura presente nas amostras de queijo foi determinado pela transferência, através de um filtro com sulfato de sódio anidro, de 5 mL do extracto de gordura bruta para um balão previamente tarado numa balança Mettler Toledo AB204-S. O solvente foi eliminado a 40°C utilizando um rotavapor Büchi Heating Bath B490. Após se atingir a temperatura ambiente, pesou-se o balão e determinou-se a quantidade de gordura presente no extracto como a diferença entre as duas pesagens. Cada determinação foi feita em duplicado e os resultados expressos em % (m/m) numa base seca e numa base húmida.

2.5. Derivatização dos ácidos gordos totais

Em tubos de centrífuga adicionaram-se 3 mL de EGB e 2 mL de hidróxido de potássio metanólico 2N e agitou-se. De seguida procedeu-se à adição de 2 mL de uma solução salina de cloreto de sódio 1% e agitou-se esta mistura. Rejeitou-se a fase aquosa e recolheu-se a fase orgânica que foi lavada duas vezes com 2 mL de água destilada. De seguida adicionou-se sulfato de sódio anidro para eliminar vestígios de água e filtrou-se o extracto orgânico seco para um balão previamente tarado. O balão foi colocado num rotavapor Büchi Heating Bath B490 a 40°C e após a evaporação total do solvente adicionaram-se 5 mL de éter de petróleo para redissolver os ésteres metílicos dos ácidos gordos; transferiu-se 1 mL desta solução para um frasco de 2 mL e adicionou-se 1 mL de solução padrão de ácido heptadecanóico (500 mg/50 mL) e procedeu-se à análise desta mistura por GC-MS.

Os ésteres metílicos dos ácidos gordos foram separados e identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa utilizando um equipamento Focus GC – Polaris Q (Thermounicam), equipado com uma coluna DB5-MS com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. As amostras foram injectadas com um amostrador automático (AS2000) e o volume de injeção foi de 1 µL. A temperatura do injector foi de 270°C e a injeção foi efectuada em modo sem repartição de fluxo, durante 2 min, após o que a válvula de repartição de fluxo foi aberta com um fluxo de 30 mL/min.

A temperatura inicial do forno foi de 40°C, tendo-se mantido nesse valor durante 2 minutos; de seguida a temperatura foi programada até 140°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, seguida de aumento para 280°C a uma taxa de 5°C/min. A temperatura da interface foi de 270°C e a temperatura da fonte iónica foi de 250°C.

As áreas cromatográficas dos ésteres metílicos foram avaliadas e a sua concentração individual foi calculada em termos relativos como a percentagem da área cromatográfica total e em termos absolutos por comparação com uma mistura de ésteres metílicos de concentração conhecida (Supelco 47885). A identificação de cada éster metílico individual foi efectuada por análise do seu espectro de

massa, da ordem de eluição e por comparação com os tempos de retenção do padrão de ésteres metílicos utilizado bem como comparação do espectro de massa de padrões autênticos e de espectros da biblioteca de espectros (Wiley, NIST).

A quantificação do ácido linoleico conjugado (CLA) foi efectuada através do traçado de uma recta de calibração na gama de 1 mg/L a 10 mg/L, construída por injeção de padrões autênticos com concentrações distribuídas nesta gama de trabalho.

2.6. Preparação das soluções padrão de CLA

A partir de uma solução padrão de concentração 100 mg/L, obtida através de um padrão O5632 Sigma prepararam-se seis soluções de CLA de concentrações 1, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/L. Em balões volumétricos de 25 mL adicionaram-se os respectivos volumes indicados na tabela 2.1 da solução-mãe de 100 mg/L e perfez-se o volume com éter de petróleo. Estas soluções foram injectadas no aparelho de GC-MS sob as mesmas condições utilizadas na injeção dos ésteres metílicos das amostras de queijo e do padrão Supelco 500ppm 47885.

Tabela 2.1: Concentração final de CLA e volume de solução-mãe pipetado para os respectivos balões de 25 mL.

Concentração de CLA (mg/L)	Volume de solução de 100 mg/L pipetado (mL)
1	0,25
2	0,5
4	1
6	1,5
8	2
10	2,5

2.7. Tratamento Estatístico

As médias das determinações realizadas foram comparadas através da análise de variância (ANOVA) e foram determinados os subgrupos homogêneos de médias que não apresentavam diferenças significativas através do teste de Tukey. Estes cálculos foram efectuados utilizando o software SPSS.

3. Resultados e Discussão

3.1. Amostragem e sua composição química

As amostras de queijo utilizadas foram provenientes de dois lotes diferentes, A e B. De cada lote analisaram-se queijos com diferentes tempos de maturação, nomeadamente 8, 17, 28 e 40 dias, de forma a determinar as variações que ocorrem a nível dos ácidos gordos ao longo do processo de maturação do queijo.

Tabela 3.1: Identificação das amostras de queijo de S. João da ilha do Pico incluídas neste trabalho.

Lote	Código da amostra	Tempo de maturação (dias)
A	A-8	8
	A-17	17
	A-28	28
	A-40	40
B	B-8	8
	B-17	17
	B-28	28
	B-40	40

Os teores de humidade dos mesmos queijos foram anteriormente determinados e apresentam-se na figura 3.1 (Soares, 2013).

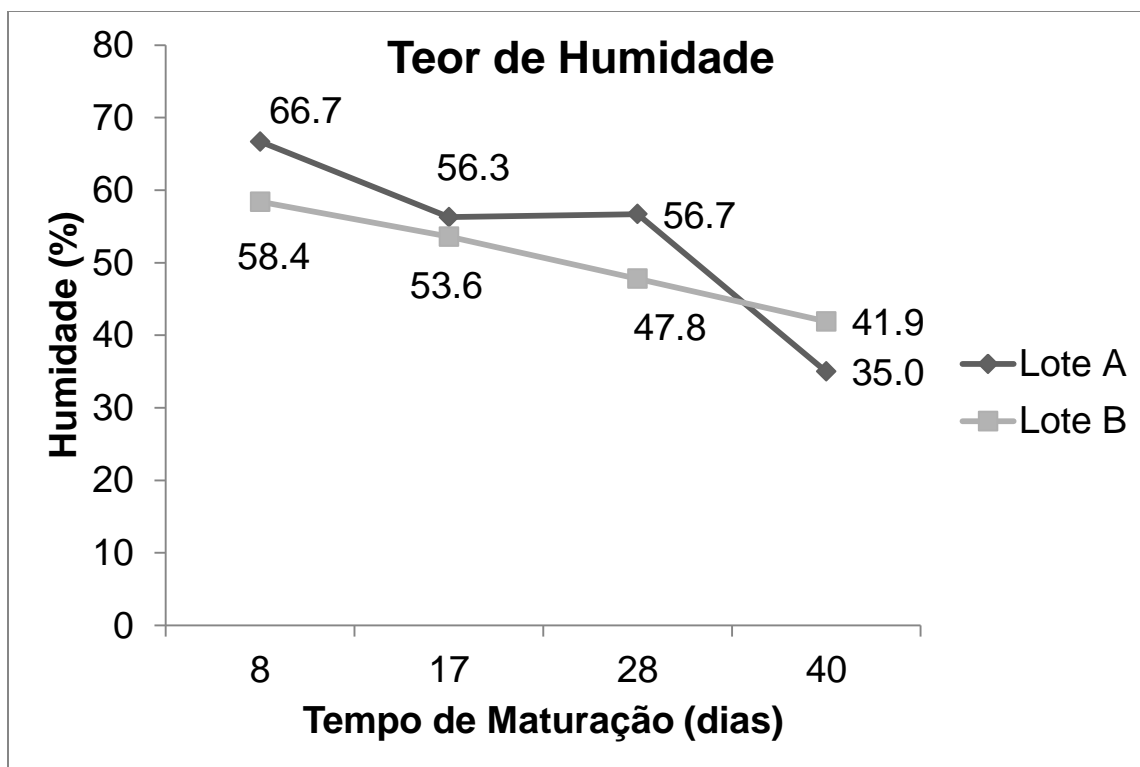


Figura 3.1: Teor de humidade das amostras de queijo de S. João da ilha do Pico estudadas.

Os resultados descritos na figura 3.1 evidenciam que, o teor em humidade tem tendência a diminuir com o tempo de maturação o que é expectável tendo em conta a evaporação de água que ocorre nesse período especialmente nos primeiros dias, antes de se formar a camada externa mais consistente e impermeável. Nos primeiros 8 dias de maturação, existe um teor de humidade de 66,7% no caso das amostras do lote A, e de 58,4% no lote B e, ao fim de 40 dias de estarem sujeitos ao processo de maturação, os mesmos queijos apresentam um teor de 35,0% e 41,9%, respectivamente (Soares, 2013). De realçar a diferença nos teores de humidade apresentados para cada lote do mesmo queijo o que evidencia como o processo de produção afecta as características finais do queijo.

Por outro lado observou-se que as amostras do lote A que apresentavam o maior teor de humidade inicial foram as que apresentaram o mais baixo teor de humidade final o que parece indicar que estas variáveis não estão necessariamente correlacionadas.

Resultados comparáveis foram obtidos por Serhan e colaboradores no caso de queijo de cabra; estes autores obtiveram um teor de humidade médio de 56,0% para queijo com 20 dias de maturação e de 52,2% para queijo com 60 dias de maturação (Serhan et al., 2010).

A mesma relação se evidenciou nos estudos levados a cabo por Ceruti e colaboradores e por Bertolino e colaboradores em queijos Reggiano e Castelmagno, respectivamente.

Os queijos Reggiano apresentaram um valor máximo de humidade para as amostras com 3 dias de maturação (45,5%) e um valor mínimo para as amostras com 90 dias (35,2%); os queijos

Castelmagno apresentaram um teor de humidade de 37,9% para as amostras com 61 dias de maturação e de 36,1% para as amostras com 180 dias de maturação (Ceruti et al., 2012; Bertolino et al., 2011).

3.2. Teor de gordura

No decorrer desta investigação procedeu-se à determinação do teor de gordura das amostras de queijo estudadas, estando os resultados referentes a este parâmetro descritos nas tabelas 3.2 e 3.3.

Tabela 3.2: Teor médio de gordura presente nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico de dois lotes diferentes e respectivos desvios padrão.

Lote	Tempo de maturação (dias)	Teor de gordura (% de peso húmido)	Teor de gordura (% de peso seco)
A	8	12,0 ± 3,0 ^a	35,9 ± 8,9 ^a
	17	16,3 ± 7,1 ^a	37,3 ± 16,1 ^a
	28	24,4 ± 6,5 ^{ab}	56,3 ± 15,0 ^a
	40	31,4 ± 14,1 ^b	48,2 ± 21,7 ^a
B	8	14,8 ± 3,7 ^a	35,5 ± 8,9 ^a
	17	22,1 ± 8,7 ^{ab}	47,6 ± 18,7 ^a
	28	23,6 ± 13,2 ^{ab}	45,1 ± 25,2 ^a
	40	22,9 ± 12,0 ^{ab}	39,5 ± 20,7 ^a

*Médias classificadas com diferentes letras na mesma coluna apresentam entre si diferenças significativas (p<0,05)

Tabela 3.3: Teor médio de gordura presente nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico e respectivos desvios padrão em função do tempo de maturação.

Tempo de maturação (dias)	Teor de gordura (% de peso húmido)	Teor de gordura (% de peso seco)
8 dias	13,4 ± 3,5 ^a	35,7 ± 8,6 ^a
17 dias	19,2 ± 8,2 ^{ab}	42,5 ± 17,7 ^a
28 dias	24,0 ± 10,0 ^b	50,7 ± 20,8 ^a
40 dias	27,1 ± 13,4 ^b	43,8 ± 21,0 ^a

*Médias classificadas com diferentes letras na mesma coluna apresentam entre si diferenças significativas (p<0,05)

Seleccionou-se um procedimento de extracção da gordura a frio para minimizar eventuais processos de degradação ou isomerização dos ácidos gordos que poderiam ocorrer em processos de extracção sob aquecimento. A sequestração da água com sulfato de sódio anidro facilita a interacção do solvente de extracção com a matriz e a utilização de ácido permite quebrar algumas ligações de lípidos a outros componentes do queijo e desta forma melhorar o rendimento de extracção.

Analisando a tabela 3.2, verifica-se que o teor em gordura expresso em peso húmido, presente nas amostras de queijo tende a aumentar com o tempo de maturação ($p < 0,05$), à excepção do caso do lote B, que não apresenta diferenças significativas no teor de gordura expresso em peso húmido entre os 17 dias e os 40 dias de maturação.

Este comportamento é expectável pois mesmo que bioquimicamente não ocorram reacções que alterem de forma significativa os teores dos componentes lipídicos do queijo a diminuição do teor de humidade que ocorre durante o processo de maturação provoca necessariamente um aumento do teor de gordura quando expresso em peso húmido.

No caso do teor expresso em peso seco, existem algumas variações nos valores individuais tanto no caso do lote A como no caso do lote B, contudo, essas variações não foram estatisticamente significativas. Este resultado indica que se durante o processo de maturação dos queijos a componente lipídica do leite é utilizada como fonte de energia pela população de microorganismos, devem também ser produzidos outros lípidos em quantidade suficiente para que não se detectem variações significativas no teor de gordura expresso numa base seca. Também pode acontecer que num período de maturação mais longo se possam observar variações mais acentuadas da componente lipídica que não foram observadas para as amostras deste trabalho.

A tabela 3.3 compara a evolução do teor de gordura em função do tempo de maturação, considerando os valores médios dos dois lotes para os vários períodos de maturação. Nesta tabela pode-se evidenciar que existe uma diferença significativa entre os teores obtidos para as amostras com 8 dias de maturação e as amostras com 28 e 40 dias de maturação, para o caso do teor em peso húmido e a inexistência de diferenças significativas no caso do teor expresso em função do peso seco.

O caso verificado no lote A coincide com a situação verificada no caso de queijos Castelmagno por Bertolino e colaboradores onde se evidencia um aumento de 25,8% para 31,4% ao longo de cerca de 90 dias, e pode dever-se ao facto de existir aumento nas concentrações dos ácidos gordos ao longo da maturação do queijo (Bertolino et al., 2011). Também é de esperar que o teor de gordura seja maior, pois os queijos mais velhos apresentam menor teor de humidade, ou seja, perdem água com a idade, o que também implica que a gordura, assim como outros componentes do queijo, se encontrem mais concentrados.

O caso do lote B foi verificado por Serhan e colaboradores, tendo-se verificado no seu caso um aumento no teor médio de gordura nos queijos com 40 dias de maturação (44,62%) em relação aos queijos com 20 dias de maturação (43,83%) mas um decréscimo no valor médio deste parâmetro entre os 60 dias (43,47%) e os 40 dias de maturação (44,62%) do queijo de cabra estudado neste trabalho

(Serhan et al., 2010). Também se evidenciou esta situação num estudo conduzido por Farahani e colaboradores em queijos de ovelha, onde se demonstrou um aumento progressivo nos valores de gordura entre os 3 e os 90 dias de maturação, de 18,12% a 31,75% (expresso em peso húmido) e de 46,64% a 51,98% (expresso em peso seco) e um decréscimo entre os 90 e os 120 dias (30,12% expresso em peso húmido e 48,00% expresso em peso seco) (Farahani et al., 2013).

A tabela 3.3 evidencia que existe, em geral, um aumento do teor médio de gordura, expresso em peso húmido com o evoluir do processo de maturação do queijo, e a consequente perda de água; o mesmo não ocorre quando se expressa este parâmetros em peso seco o que aponta para o equilíbrio entre consumo e produção de lípidos por parte dos microrganismos presentes nas amostras.

3.3. Determinação do perfil de ésteres metílicos de ácidos gordos de queijo de S. João da ilha do Pico com diferentes tempos de maturação

O perfil de ésteres metílicos dos ácidos gordos do queijo de S. João da ilha do Pico foi determinado para diferentes tempos de maturação e apresentam-se na Figura 3.2, os cromatogramas correspondentes aos 8 dias e 40 dias de maturação.

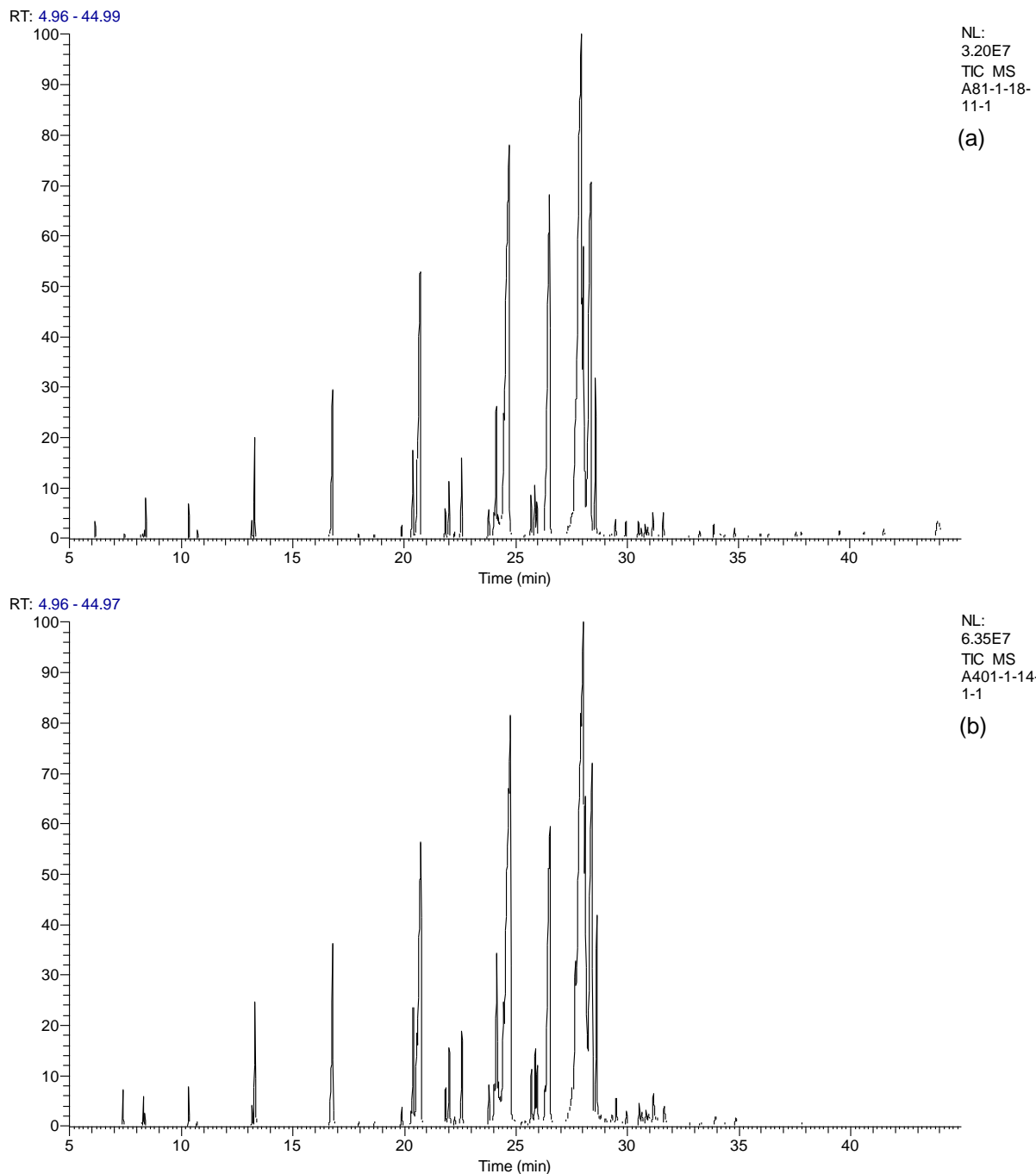


Figura 3.2: Cromatogramas obtidos para os ésteres metílicos dos ácidos gordos de amostras de queijo de S. João da ilha do Pico com (a) 8 dias de maturação e (b) 40 dias de maturação.

Cada éster metílico detectado foi identificado por comparação do seu tempo de retenção com um padrão autêntico (Supelco 500ppm 47885) e por comparação do seu espectro de massa com espectros de padrões das bibliotecas NIST e WILEY.

Na tabela 3.4 encontram-se representados os ésteres metílicos dos ácidos gordos identificados bem como as respectivas janelas de retenção.

Tabela 3.4: Ácidos gordos totais evidenciados nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico estudadas e respectivas janelas de retenção.

Nome IUPAC	Nome comum	Abreviatura	Janela de Retenção (min)
Ácido hexanóico	Ácido capróico	C6:0	7,41 – 7,49
Ácido octanóico	Ácido caprílico	C8:0	10,32 – 10,34
Ácido decenóico		C10:1	13,16
Ácido decanóico	Ácido cáprico	C10:0	13,28 – 13,30
Ácido dodecanóico	Ácido láurico	C12:0	16,77 – 16,79
Ácido tridecanóico	Ácido tridecílico	C13:0	18,64 – 18,66
Ácido tetradecenóico	Ácido mirístoleico	C14:1	20,38 – 20,40
Ácido tetradecanóico	Ácido mirístico	C14:0	20,69 – 20,73
Ácido pentadecenóico		C15:1	22,24 – 22,26
Ácido pentadecanóico	Ácido pentadecílico	C15:0	22,57 – 22,59
Ácido hexadecenóico	Ácido palmitoleico	C16:1	24,12 – 24,14
Ácido hexadecanóico	Ácido palmítico	C16:0	24,67 – 24,73
Ácido heptadecenóico		C17:1	25,94 – 25,96
Ácido heptadecanóico	Ácido margárico	C17:0	26,49 – 26,55
Ácido 9,12-octadecadienóico (trans)	Ácido linoleláidico	C18:2	27,52 – 27,54
Ácido 9,12-octadecadienóico (cis)	Ácido linoleico	C18:2	27,65 – 27,67
Ácido 11-octadecenóico (trans)	Ácido vacénico	C18:1	27,92 – 27,98
Ácido 9-octadecenóico (cis)	Ácido oleico	C18:1	28,01 – 28,07
Ácido octadecanóico	Ácido esteárico	C18:0	28,33 – 28,39
Ácido cis-9,trans-11 octadecadienóico	Ácido linoleico conjugado	C18:2	28,56 – 28,60
Ácido nonadecenóico		C19:1	29,47 – 29,49
Ácido nonadecanóico	Ácido nonadecílico	C19:0	29,93 – 29,95
Ácido eicosapentaenóico		C20:5	30,61 – 30,65
Ácido eicosatrienóico		C20:3	30,80 – 30,82
Ácido eicosenóico	Ácido gondóico	C20:1	31,15 – 31,17

Tabela 3.4 (continuação)

Ácido eicosanóico	Ácido araquídico	C20:0	31,61 – 31,65
Ácido heneicosenóico		C21:1	32,77 – 32,83
Ácido docosaheptaenóico		C22:6	33,87 – 33,95
Ácido docosenóico	Ácido erucico	C22:1	34,35 – 34,39
Ácido docosanóico	Ácido behénico	C22:0	34,81 – 34,87
Ácido tricosenóico		C23:1	35,99 – 36,03
Ácido tricosanóico	Ácido tricosílico	C23:0	36,32 – 36,38
Ácido tetracosanóico	Ácido lignocérico	C24:0	37,79 – 37,85
Ácido hexacosanóico	Ácido cerótico	C26:0	40,61 – 40,65

Verifica-se que os queijos analisados apresentam ácidos gordos com números de carbono entre 6 e 26, com predominância dos ácidos com 18 carbonos e com 16 carbonos, em particular os ácidos oleico, linoleico e palmítico.

Os ácidos gordos com números de carbono inferiores a 10 carbonos estão presentes em concentrações reduzidas no queijo mas tratando-se de componentes com alguma volatilidade dão um contributo importante para a definição do aroma do queijo. Já os ácidos com mais do 10 carbonos sendo menos voláteis influenciam mais o sabor do que o aroma da matriz onde se encontram.

Os ácidos gordos C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 (trans), C18:1 (cis), C18:2 (trans) e C18:2 (cis) foram encontrados em queijos produzidos a partir de leite ovelha por Vargas-Bello-Pérez e colaboradores (Vargas-Bello-Pérez et al., 2013).

À excepção do ácido láurico, estes mesmos ácidos gordos foram evidenciados em queijos mozzarella por Kim e colaboradores. Estes autores também detectaram a presença dos ácidos palmitoleico, gondóico, eicosapentaenóico e docosaheptaenóico (Kim et al., 2014).

Zhang e colaboradores detectaram a maior parte dos ácidos gordos igualmente detectados nos queijos estudados. Nomeadamente estes autores evidenciaram os ácidos gordos capríco, caprílico, cáprico, láurico, tridecílico, mirístico, mirístoleico, pentadecílico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, vacénico, linoleico, linoleláico e linoleico conjugado em comum com as amostras de queijo da ilha do Pico utilizadas neste estudo, em queijos de ovelha (Zhang et al., 2006_a).

Estes mesmos autores, noutro estudo, detectaram igualmente em queijos de ovelha os mesmos ácidos gordos anteriormente listados, excepto o ácido tridecílico, com a adição dos seguintes ácidos gordos: araquídico, gondóico, eicosatrienóico e behénico (Zhang et al., 2006_b).

Cattani e colaboradores detectaram em queijos produzidos a partir de leite de vaca todos os ácidos gordos evidenciados nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico, à excepção dos ácidos C19:1, C19:0, C21:1, C22:6, C22:1, C23:1, C23:0, C24:0 e C26:0 (Cattani et al., 2014).

Os ácidos nonadecenóico (C19:1), nonadecílico (C19:0), heneicosenóico (21:1), erucico (C22:1), tricosenóico (C23:1), tricosílico (C23:0), lignocérico (C24:0) e cerótico (C26:0) são ácidos gordos pouco referidos em outros estudos sobre perfil de ácidos gordos de queijo, como os referidos anteriormente mas que foram encontrados no queijo de S. João da ilha do Pico, o que poderá constituir uma característica diferenciadora deste queijo.

Os queijos com 8 e 17 dias de maturação acusaram a presença de colesterol quando analisados por GC-MS, enquanto nos queijos com 28 e 40 dias de maturação evidenciou-se a sua ausência. Este composto foi identificado com uma janela de retenção de 43,88 a 43,90 minutos e apesar de não ser um ácido gordo mas sim um álcool gordo é um componente típico do leite que é co-extraído e detectado nas condições do método desenvolvido.

O seu desaparecimento pode dever-se à sua metabolização por microorganismos do queijo à semelhança do que acontece a este componente alimentar durante o processo digestivo.

A concentração dos ácidos gordos totais foi determinada através da comparação das áreas absolutas obtidas para as amostras de queijo com as áreas obtidas para um padrão de concentração conhecida. Os ácidos gordos presentes no padrão utilizado (Supelco 500ppm 47885), representados na figura 3.3, as suas respectivas concentrações e janelas de retenção encontram-se representados na tabela 3.5.

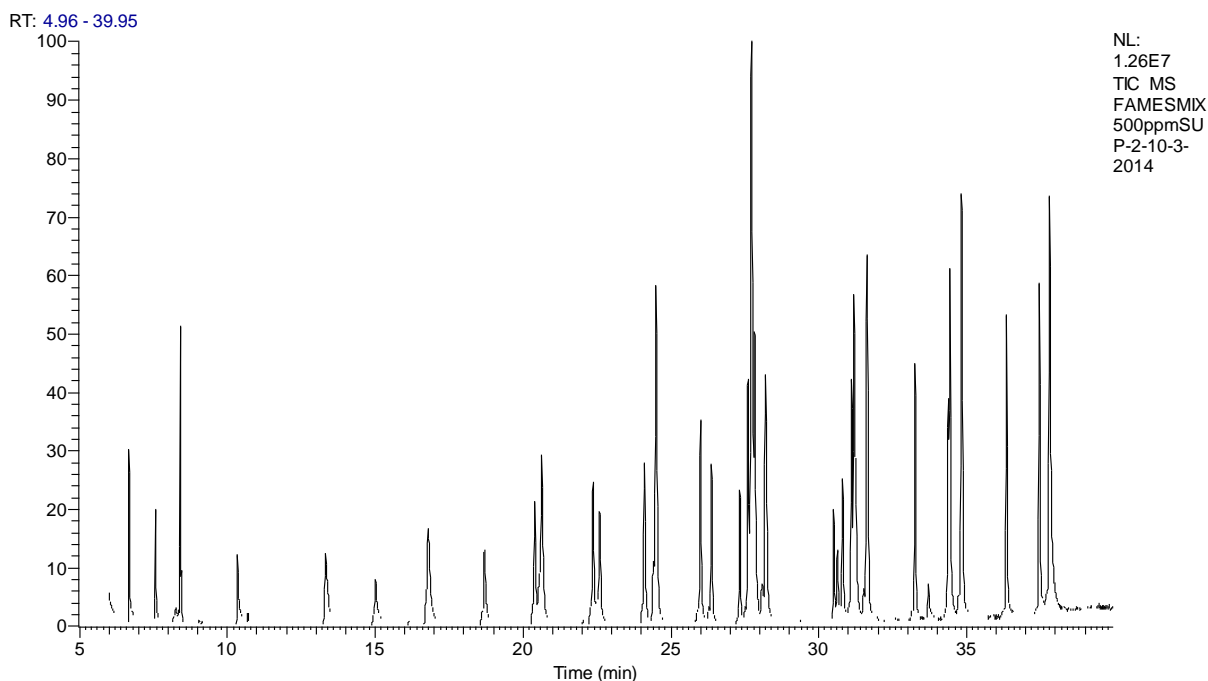


Figura 3.3: Cromatograma obtido para o padrão Supelco 500ppm 47885.

Tabela 3.5: Ácidos gordos identificados no padrão Supelco 500ppm 47885, janelas de retenção e respectivas concentrações.

Composto	Janela de retenção (minutos)	Concentração (mg/L)
Ácido capróico	7,57 – 7,61	20
Ácido caprílico	10,32 – 10,34	20
Ácido cáprico	13,27 – 13,33	20
Ácido undecanóico	14,94 – 15,02	10
Ácido láurico	16,74 – 17,00	20
Ácido tridecílico	18,65 – 19,01	10
Ácido mirístoleico	20,36 – 20,40	10
Ácido mirístico	20,60 – 20,64	20
Ácido pentadecenóico	22,31 – 22,37	10
Ácido pentadecílico	22,56 – 22,60	10
Ácido palmitoleico	24,08 – 24,10	10
Ácido palmítico	24,48 – 24,50	30
Ácido heptadecenóico	25,97 – 26,01	10
Ácido margárico	26,35 – 26,37	10
Ácido linoleláidico	27,59 – 27,61	10
Ácido linoleico	27,72	10
Ácido esteárico	28,17 – 28,21	20
Ácido eicosapentaenóico	30,48 – 30,52	10
Ácido gondóico	31,18 – 31,20	10
Ácido araquídico	31,61 – 31,63	20
Ácido docosaheptaenóico	30,61 – 30,63	10
Ácido behénico	34,82 – 34,84	20
Ácido tricosílico	36,33 – 36,35	10
Ácido lignocérico	37,79 – 37,81	20

A concentração do CLA foi determinada através da realização de uma curva de calibração com seis diferentes concentrações deste composto, obtidas a partir de um padrão O5632 Sigma. As concentrações utilizadas para se traçar esta curva foram de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/L e a curva obtida encontra-se representada na figura 3.4.

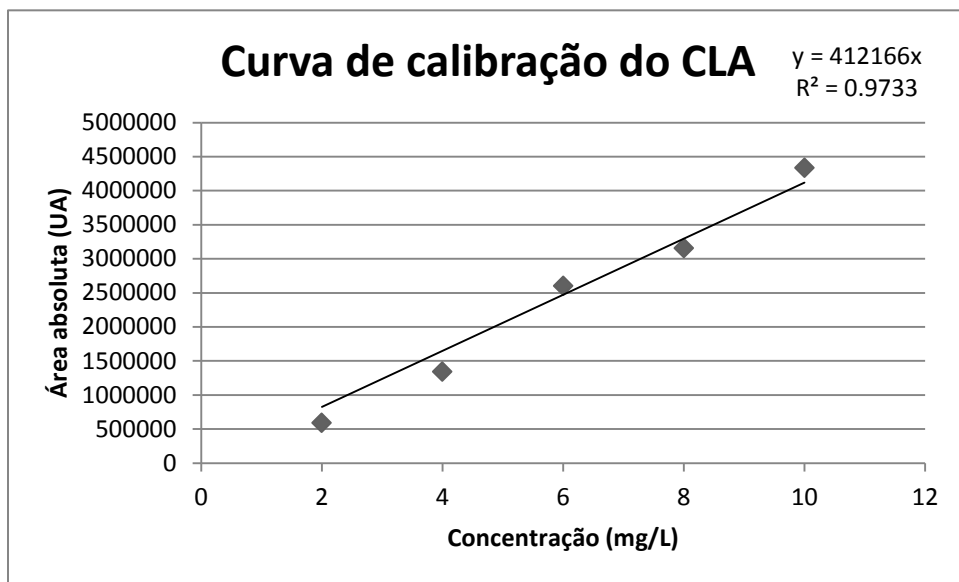


Figura 3.4: Curva de calibração do ácido linoleico conjugado.

Na tabela 3.6 encontram-se representadas as concentrações médias e respectivos desvios padrão dos ácidos gordos totais identificados nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico utilizadas nos diferentes tempos de maturação.

Tabela 3.6: Variação da concentração, em função do tempo de maturação, dos ácidos gordos presentes nas amostras estudadas.

Tempo (dias) Composto	Concentração (mg/100g) em base húmida			
	8	17	28	40
C6:0	4,74 ± 1,86 ^a	3,18 ± 1,35 ^a	8,05 ± 0,90 ^a	25,20 ± 7,51 ^b
C8:0	12,38 ± 1,03 ^a	10,98 ± 2,99 ^a	14,17 ± 1,44 ^a	37,68 ± 10,20 ^b
C10:1	4,13 ± 0,68 ^a	4,13 ± 0,96 ^a	4,29 ± 0,52 ^a	10,73 ± 3,21 ^b
C10:0	26,89 ± 3,85 ^a	26,21 ± 5,75 ^a	28,46 ± 3,10 ^a	84,41 ± 18,63 ^b

Tabela 3.6 (continuação)

C12:0	47,28 ± 6,80 ^a	45,68 ± 9,95 ^a	48,97 ± 6,86 ^a	126,27 ± 29,47 ^b
C13:0	0,80 ± 0,13 ^a	0,75 ± 0,17 ^a	0,81 ± 0,18 ^a	2,09 ± 0,68 ^b
C14:1	19,66 ± 3,37 ^a	20,73 ± 4,18 ^a	20,95 ± 2,76 ^a	53,73 ± 10,57 ^b
C14:0	150,56 ± 18,31 ^a	133,41 ± 25,75 ^a	149,27 ± 21,91 ^a	350,25 ± 72,21 ^b
C15:1	0,93 ± 0,15 ^a	0,98 ± 0,22 ^a	0,98 ± 0,14 ^a	3,16 ± 0,79 ^b
C15:0	17,87 ± 2,36 ^a	15,50 ± 3,34 ^a	17,46 ± 2,95 ^a	41,19 ± 9,09 ^b
C16:1	25,33 ± 6,28 ^a	26,64 ± 5,47 ^a	27,45 ± 3,58 ^a	75,70 ± 23,01 ^b
C16:0	659,32 ± 77,14 ^a	538,83 ± 103,67 ^a	628,54 ± 101,97 ^a	1329,54 ± 261,57 ^b
C17:1	5,61 ± 1,01 ^a	6,23 ± 1,17 ^a	6,20 ± 0,79 ^a	17,71 ± 3,87 ^b
C17:0	214,69 ± 80,53 ^a	243,66 ± 6,45 ^a	217,46 ± 8,73 ^a	383,25 ± 18,11 ^b
C18:2 (trans)	1,75 ± 1,50 ^a	3,84 ± 0,67 ^a	3,73 ± 0,66 ^a	10,79 ± 2,82 ^b
C18:2 (cis)	6,69 ± 4,30 ^a	9,02 ± 0,93 ^a	8,61 ± 1,03 ^a	26,05 ± 4,57 ^b
C18:1 (trans)	142,50 ± 63,32 ^a	175,38 ± 29,55 ^a	180,64 ± 19,29 ^a	369,07 ± 72,84 ^b
C18:1 (cis)	31,32 ± 13,06 ^a	36,16 ± 7,79 ^a	40,22 ± 6,28 ^a	88,85 ± 14,49 ^b
C18:0	176,06 ± 74,48 ^a	152,01 ± 34,08 ^a	186,50 ± 35,64 ^a	353,67 ± 68,26 ^b
C18:2 (CLA)	98,45 ± 42,23 ^a	121,92 ± 25,75 ^a	125,51 ± 17,91 ^a	299,97 ± 61,10 ^b
C19:1	3,08 ± 1,35 ^a	3,84 ± 0,83 ^a	4,00 ± 0,56 ^a	11,11 ± 2,88 ^b
C19:0	2,84 ± 1,19 ^a	2,73 ± 0,30 ^a	2,76 ± 0,41 ^a	5,64 ± 0,80 ^b
C20:5	3,01 ± 1,33 ^a	3,95 ± 0,92 ^a	3,85 ± 0,56 ^a	10,57 ± 3,23 ^b
C20:3	0,94 ± 0,40 ^a	1,21 ± 0,29 ^a	1,13 ± 0,15 ^a	2,66 ± 0,71 ^b
C20:1	2,33 ± 1,00 ^a	3,05 ± 0,78 ^a	2,89 ± 0,41 ^a	7,31 ± 1,90 ^b
C20:0	4,31 ± 1,81 ^a	3,70 ± 0,98 ^a	3,23 ± 0,93 ^a	7,56 ± 1,63 ^b
C21:1	0,44 ± 0,19 ^a	0,50 ± 0,14 ^a	0,59 ± 0,12 ^a	1,37 ± 0,39 ^b
C22:6	2,76 ± 1,25 ^a	3,83 ± 0,92 ^a	3,74 ± 0,67 ^a	9,26 ± 3,27 ^b
C22:1	0,65 ± 0,28 ^a	1,05 ± 0,51 ^a	0,94 ± 0,32 ^a	5,33 ± 1,41 ^b
C22:0	1,14 ± 0,48 ^a	0,91 ± 0,30 ^a	1,11 ± 0,36 ^a	3,02 ± 0,97 ^b
C23:1	0,34 ± 0,15 ^a	0,41 ± 0,14 ^a	0,42 ± 0,09 ^a	1,88 ± 0,59 ^b
C23:0	0,37 ± 0,16 ^a	0,35 ± 0,17 ^a	0,41 ± 0,12 ^a	1,55 ± 0,53 ^b
C24:0	0,60 ± 0,25 ^a	0,66 ± 0,33 ^a	0,53 ± 0,19 ^a	1,80 ± 0,32 ^b

Tabela 3.6 (continuação)

C26:0	0,77 ± 0,33 ^a	1,10 ± 0,57 ^a	0,59 ± 0,12 ^a	1,06 ± 0,86 ^a
-------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

*Médias classificadas com diferentes letras na mesma linha apresentam entre si diferenças significativas ($p < 0,05$)

As concentrações dos ácidos gordos individuais determinadas nas amostras de queijos, com tempos de maturação entre 8 e 40 dias aumentam ao longo do tempo ou seja, quanto mais maturado for um queijo, maior será a concentração de um certo ácido gordo neste, no entanto, só se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos para os 40 dias e restantes tempos de maturação. Este aumento parece dever-se à perda de água durante a maturação, o que implica, como já foi referido, que os ácidos gordos presentes cada vez se encontrem mais concentrados.

É de notar que, as alterações nos valores de concentração entre os 28 e 17 dias e os 17 e 8 dias não são muito acentuadas, obtendo-se para estes períodos valores muito próximos uns dos outros. Contudo é de se destacar que entre os 28 e os 40 dias de maturação, em geral, existe um grande crescimento nos teores dos diferentes ácidos gordos, evidenciando-se que, no espaço de 12 dias de diferença, existe um aumento da concentração para o seu dobro, ou até um crescimento superior, tal como se evidencia no caso do ácido erúico, cuja concentração aos 40 dias é cerca de cinco vezes a sua concentração aos 28 dias.

Os ácidos gordos existentes em maior concentração são os ácidos palmítico, esteárico, mirístico, vacénico e CLA (ácido linoleico conjugado), podendo-se estimar que estes terão um papel importante no aroma e sabor do queijo de S. João da ilha do Pico, dentro desta classe de compostos responsáveis pelo aroma deste produto lácteo. O ácido margárico apresenta uma grande concentração, mas que resulta da sua adição às amostras como padrão interno de forma a monitorizar a efectividade da análise por GC-MS, nomeadamente a consistência do método de injeção; tal como é hábito para qualquer padrão interno foi previamente verificado que este ácido gordo está ausente das amostras de queijo ou está presente em concentrações vestigiais.

Ao longo dos períodos de maturação estudados, os ácidos gordos que apresentam uma maior variação desde os 8 dias até os 40 dias são os mesmos que apresentam uma maior concentração, ou seja, C16:0, que apresenta uma variação de 659,32 a 1329,54 mg/100g, C18:0, variando de 176,06 mg/100g aos 8 dias de maturação para 353,67 mg/100g aos 40 dias, C14:0, variando ao longo dos 32 dias de 150,56 a 350,25 mg/100g, C18:1 (trans) (142,50 a 369,07 mg/100g) e C18:2 (CLA), apresentando este último uma variação de 98,45 mg/100g aos 8 dias a 299,97 mg/100g aos 40 dias de maturação, sendo que entre estes, o que apresenta uma maior variação é o ácido palmítico. Em geral, existe uma maior variação na concentração dos ácidos gordos com um número de carbonos igual ou inferior a 18, e uma variação menos acentuada para o caso dos ácidos gordos com um número de carbonos maior que 18, sendo o que apresenta uma menor variação é o ácido cerótico, variando este de 0,77 mg/100g a 1,06 mg/100g. Esta observação pode sugerir que os ácidos gordos com um maior número de carbono estão a ser degradados a ácidos gordos de menores dimensões, o que se pode

dever à actividade das bactérias presentes nos queijos, nomeadamente LAB (*Lactic Acid Bacterias*), que têm tendência a degradar os ácidos gordos de maiores dimensões a ácidos gordos de pequena a média dimensão (Collins et al., 2003).

Este aumento da concentração dos ácidos gordos com a maturação foi igualmente evidenciado por Malacarne e colaboradores em queijos Parmigiano-Reggiano ao longo de 24 meses sujeitos a maturação, por Franco e colaboradores em queijos Babia-Laciana, um queijo de cabra tradicional espanhol, sujeitos a um período de maturação de 60 dias e por Sihufe e colaboradores em queijos tradicionais argentinos, Reggianito Argentino, maturados ao longo de 186 dias (Malacarne et al., 2009; Franco et al., 2003; Sihufe et al., 2007).

Malacarne e colaboradores, ao longo dos 24 meses de maturação a que as suas amostras de queijo estiveram sujeitas, evidenciaram que ocorreu uma maior variação nas concentrações dos ácidos C18:1, destacando-se um aumento de 1593,75 mg/kg a 8798,94 mg/kg, C16:0 com um aumento de 1447,69 a 6650,91 mg/kg num espaço de 24 meses, C14:0 alterando a sua concentração ao longo deste período de 411,89 mg/kg a 2283,56 mg/kg e C18:0, com uma alteração de 847,34 mg/kg para 2239,77 mg/kg. Estes autores, à excepção do CLA que não foi evidenciado nos seus queijos, obtiveram uma maior variação nos mesmos ácidos gordos que os obtidos neste estudo do queijo de S. João da ilha do Pico (Malacarne et al., 2009).

Franco e colaboradores observaram que dos ácidos gordos evidenciados no seu estudo, os que apresentaram uma maior variação ao longo dos 60 dias a que os queijos estiverem sujeitos ao processo de maturação foram os ácidos vacénico, variando de 110,0 mg/kg para 1179,5 mg/kg, palmítico, apresentando uma variação de 89,7 mg/kg evidenciados em queijos não maturados a 461,8 mg/kg evidenciados em queijos com 60 dias de maturação, esteárico, com uma concentração inicial de 80,5 mg/kg e final de 268,3 mg/kg e mirístico, com uma variação de 54,8 para 204,9 mg/kg. Tal como no caso anterior, estes autores obtiveram maiores variações nas concentrações dos mesmos ácidos gordos evidenciados neste estudo, com a excepção do ácido linoleico conjugado que não foi determinado por estes autores (Franco et al., 2003).

No estudo levado a cabo por Sihufe e colaboradores, os ácidos gordos que apresentaram uma maior variação na sua concentração entre os 62 e os 186 dias de maturação foram os ácidos vacénico (C18:1) com uma variação de 539 mg/kg a 719 mg/kg, palmítico (C16:0) variando de 528 mg/kg a 686 mg/kg e mirístico (C14:0), variando de 203 para 272 mg/kg ao longo do período estudado. Este estudo apresentou em comum os ácidos vacénico, palmítico e mirístico com as amostras de queijo de S. João da ilha do Pico como os ácidos com maior variação ao longo da maturação (Sihufe et al., 2007).

Macedo e Malcata evidenciaram a variação de concentração de ácidos gordos com a maturação num outro queijo tradicional português, nomeadamente o Queijo da Serra, estando este exposto a uma maturação de 35 dias. Estes autores evidenciaram que os ácidos gordos que mais variaram neste queijo típico português foram os ácidos gordos C18:1, C16:0, C14:0, C12:0 e C18:0. O ácido C18:1 variou ao longo dos 35 dias de 2243 mg/kg para 4137 mg/kg, o ácido C16:0 variou de 2733 a 4141 mg/kg, o ácido

C14:0 aumentou de 120 a 716 mg/kg e o C18:0 variou de 3298 a 3426 mg/kg. Estes ácidos gordos foram os mesmos evidenciados com maior variação nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico ao longo dos 40 dias de maturação. Para além destes, o queijo da Serra também apresentou uma grande variação para o ácido C12:0, tendo este aumentado de 569 mg/kg para 791 mg/kg ao longo dos 35 dias (Macedo & Malcata, 1996).

É importante realçar que nenhum destes queijos aqui discutidos apresentou CLA, à excepção do queijo de S. João da ilha do Pico, que apresentou este como um dos ácidos gordos com uma maior variação na sua concentração ao longo do processo de maturação.

Uma vez que este ácido gordo apresenta imensos efeitos benéfico para a saúde, como foi destacado na secção 1.1 deste trabalho, é uma mais-valia para a promoção do consumo deste queijo típico dos Açores, de origem protegida (DOP).

Ao longo dos anos tem sido evidenciada a presença de CLA principalmente em queijos produzidos a partir de leite de vaca e ovelha. Sendo o queijo de S. João da ilha do Pico produzido a partir de leite de vaca, era de esperar que este apresentasse na sua composição o ácido linoleico conjugado em concentrações relativamente grandes.

A evidência deste ácido gordo encontra-se destacada num cromatograma obtido para amostras de queijo de S. João da ilha do Pico com 40 dias de maturação, na figura 3.5.

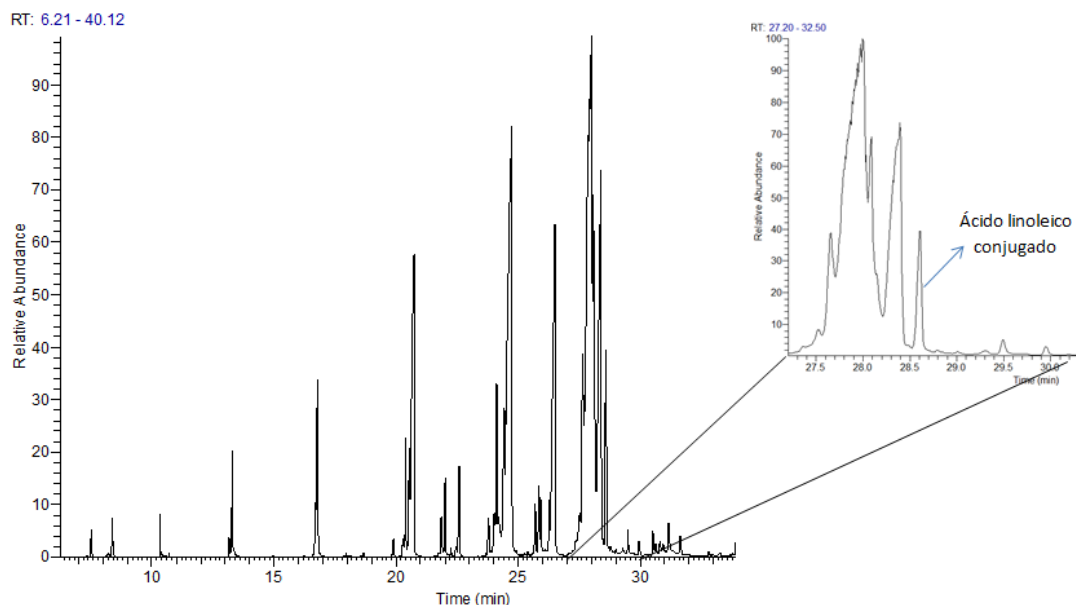


Figura 3.5: Evidência da presença de CLA nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico estudadas neste trabalho prático.

Apesar do queijo de S. João da ilha do Pico apresentar a vantagem de possuir o ácido linoleico conjugado na sua composição numa grande concentração, e igualmente o ácido vacénico que pode ser

convertido neste primeiro também numa grande concentração, quando comparado com outros queijos, não deixa de ser um produto alimentar onde predominam os ácidos gordos saturados, seguidos dos ácidos gordos insaturados, e sendo a concentração global dos ácidos gordos poliinsaturados a mais baixa de todas, (figura 3.6).

Os ácidos gordos saturados são relativamente perigosos quando ingeridos em grandes quantidades na nossa dieta pois aumentam o risco de doença coronária do coração. Os ácidos gordos poliinsaturados apresentam o comportamento inverso, sendo estes benéficos na prevenção deste distúrbio cardíaco (Monge-Rojas et al., 2013).

Sendo assim, aconselha-se uma ingestão consciente deste queijo, tendo em consideração os seus efeitos benéficos devido à presença de CLA mas ao mesmo tempo com alguma moderação devido aos elevados teores de ácidos gordos saturados em relação aos monoinsaturados e poliinsaturados.

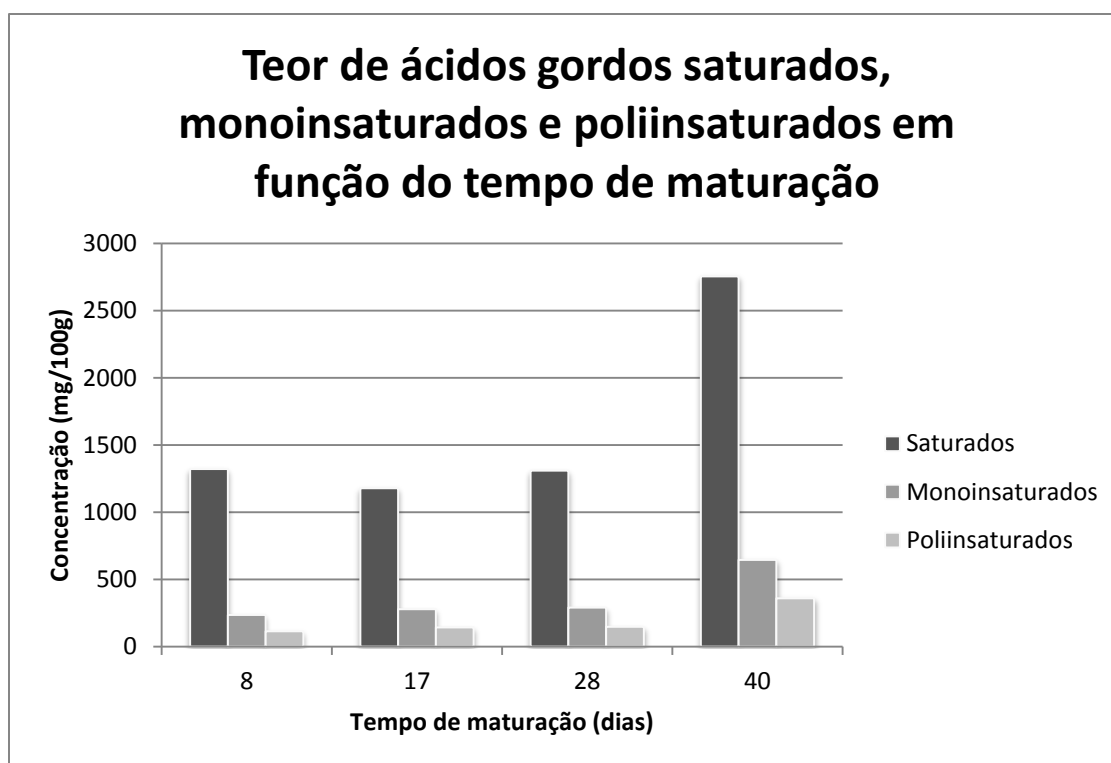


Figura 3.6: Teor de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados presentes nas amostras de queijo de S. João da ilha do Pico em função do tempo de maturação.

Como referido para os ácidos gordos individuais observa-se que só na transição entre os 28 dias de maturação e os 40 dias de maturação se observam variações mais acentuadas dos conteúdos de ácidos gordos do queijo de S. João da ilha do Pico.

4. Conclusão

O objectivo deste estudo prático foi a determinação e quantificação dos ácidos gordos totais presentes em amostras de queijo de S. João da ilha do Pico e a averiguação da sua variação com o decorrer do processo de maturação.

Dito isto pode-se concluir que os objectivos foram alcançados tendo-se evidenciado nas diferentes amostras 34 ácidos gordos e tendo-se estabelecido a relação entre a variação da sua concentração e a duração do processo de maturação do queijo.

Todos estes ácidos gordos aumentaram com o tempo, atingindo maiores concentrações com o aumento do período a que os queijos estiveram sujeitos a maturação. Dentro dos 34 ácidos gordos quantificados, os que mais variaram ao longo do tempo foram os ácidos palmítico, mirístico, vacénico, esteárico e ácido linoleico conjugado, também conhecido por CLA do inglês *conjugated linoleic acid*.

A verificação de que certos compostos variaram mais que outros pode sugerir a hipótese que estes podem estar a ser produzidos pelas bactérias presentes no queijo, nomeadamente as bactérias lácticas, ou que os que variam menos podem estar a ser consumidos por estes microrganismos ou até a serem utilizados noutros processos que ocorrem durante a maturação.

Em suma, no queijo de S. João da ilha do Pico estima-se que existam 34 ácidos gordos que contribuem individualmente para o seu sabor característico, sendo que, provavelmente, os que mais influenciam este parâmetro são os que se apresentam em maiores concentrações ao longo do tempo, nomeadamente os ácidos palmítico, esteárico, mirístico, vacénico e CLA, por ordem decrescente.

A presença de CLA numa concentração elevada quando comparada com outras determinações deste ácido gordo em diversos queijos pode constituir um factor de valorização comercial do queijo de S. João da ilha do Pico.

5. Bibliografia

- Adda, J., Gripon, J.C. & Vassal, L. (1982) The chemistry of flavor and texture generation in cheese. *Food Chem.*, 9, pp.115-119.
- Akin, N., Aydemir, S., Koçak, C. & Yildiz, M.A. (2003) Changes of free fatty acid contents and sensory properties of white pickled cheese during ripening. *Food Chemistry*, 80, pp.77–83.
- Belury, M.A. (2002) Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, 22, pp.505–531.
- Berard, J., Bianchi, F., Careri, M., Chatel, A., Mangia, A. & Musci, M. (2007) Characterization of the volatile fraction and of free fatty acids of “Fontina Valle d'Aosta”, a protected designation of origin Italian cheese. *Food Chemistry*, 105, pp.293–300.
- Bergamini, C.V., Wolf, I.V., Perotti, M.C. & Zalazar, C.A. (2010) Characterisation of biochemical changes during ripening in Argentinean sheep cheeses. *Small Ruminant Research*, 94, pp.79-89.
- Bertolino, M., Dolci, P., Giordano, M., Rolle, L. & Zeppa, G. (2011) Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. *Food Chemistry*, 129, pp.1001-1011.
- Bontinis, T.G., Mallatou, H., Pappa, E.C., Massouras, T. & Alichanidis, E. (2012) Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Ruminant Research*, 105, pp.193– 201.
- Buffa, M., Guamis, B., Saldo, J. & Trujillo, A.J. (2004) Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 37, pp.247-253.
- Califano, A.N. & Bevilacqua, A.E. (1999) Freezing low moisture Mozzarella cheese: changes in organic acid content. *Food Chemistry*, 64, pp.193-198.
- Califano, A.N. & Bevilacqua, A.E. (2000) Multivariate Analysis of the Organic Acids Content of Gouda type Cheese during Ripening. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, pp.949-960.
- Cattani, M., Mantovani, R., Schiavon, S., Bittante, G. & Bailoni, L. (2014) Recovery of n-3 polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acids in ripened cheese obtained from milk of cows fed different levels of extruded flaxseed. *Journal of Dairy Science*, 97, pp.123-135.
- Ceruti, R.J., Zorrilla, S.E. & Sihufe, G.A. (2012) The influence of elevated initial ripening temperature on the proteolysis in Reggiano cheese. *Food Research International*, 48, pp.34-40.
- Chion, A.R., Tabacco, E., Giaccone, D., Peiretti, P.G., Battelli, G. & Borreani, G. (2010) Variation of fatty acid and terpene profiles in mountain milk and “Toma piemontese” cheese as affected by diet composition in different seasons. *Food Chemistry*, 121, pp.393–399.

- Choque, B., Catheline, D., Rioux, V. & Legrand, P. (2014) Linoleic acid: Between doubts and certainties. *Biochimie*, 96, pp.14-21.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H. & Wilkinson, M.G. (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13, pp.841-866.
- Cui, Z-G., Piao, J-L., Kondo, T., Ogawa, R., Tsuneyama, K., Zhao, Q-L., Feril Jr., L.B. & Inadera, H. (2014) Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by docosahexaenoic acid: Implication for cancer therapy. *Chemico-Biological Interactions* (Article in Press).
- De Jong, C. & Badings, H.T. (1990) Determination of Free Fatty Acids in Milk and Cheese. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13, pp.94-98.
- Deeth, H.C. & Touch, V. (2000) Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55, pp.153–168.
- Delgado, F.J., González-Crespo, J., Cava, R. & Ramírez, R. (2011) Free Fatty Acids and Oxidative Changes of a Raw Goat Milk Cheese through Maturation. *Journal of Food Science*, Vol. 76, 4, pp.C669-C673.
- Delgado, F.J., González-Crespo, J., Cava, R. & Ramírez, R. (2011) Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. *Food Chemistry*, 129, pp.1156–1163.
- Dervisoglu, M. & Yazici, F. (2001) Ripening changes of Kulek cheese in wooden and plastic containers. *Journal of Food Engineering*, 48, pp.243-249.
- Dirinck, P. & De Winne, A. (1999) Flavour characterisation and classification of cheeses by gas chromatographic–mass spectrometric profiling. *Journal of Chromatography A*, 847, pp.203–208.
- Draper, E., DeCoursey, J., Higgins, S.C., Canavan, M., McEvoy, F., Lynch, M., Keogh, B., Reynolds, C., Roche, H.M., Mills, K.H.G. & Loscher, C.E. (2014) Conjugated linoleic acid suppresses dendritic cell activation and subsequent Th17 responses. *The Journal of Nutritional Biochemistry* (Article in Press).
- El-Salam, M.H.A. & El-Shibiny, S. (2014) Conjugated linoleic acid and vaccenic acid contents in cheeses: An overview from the literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33, pp.117-126.
- Engels, W.J.M., Dekker, R., de Jong, C., Neeter, R. & Visser, S. (1997) A comparative study of volatile compounds in the watersoluble fraction of various types of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7, pp.255–263.
- Eriksen, S. (1976) Flavours of milk and milk products. I. The role of lactones. *Milchwissenschaft*, 31, pp.549–550.
- Eurostat (2013) Production of Cheese. Disponível em <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/tgm/table.do?tab=table&init=1&plugin=0&language=en&pcode=tag00040>.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) FAO Statistical Yearbook 2012. FAO – Fiat Panis, pp.58-60.

- Farahani, G., Ezzatpanah, H. & Abbasi, S. (2013) Characterization of Siahmazgi cheese, an Iranian ewe's milk variety: Assessment of physico-chemical, textural and rheological specifications during ripening. *LWT- Food Science and Technology*, XXX, pp.1-8.
- Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H. & Wallace, J. (1993) Biochemistry of cheese ripening. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: General Aspects. Chapman & Hal, 2nd ed., pp.389-438.
- Fox, P.F. & Wallace, J.M. (1997) Formation of flavour compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology*, 45, pp.17–85.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. & McSweeney, P.L.H. (2000) *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers, pp.1-8; 388-427.
- Franco, I., Prieto, B., Bernardo, A., Prieto, J.G. & Carballo, J. (2003) Biochemical changes throughout the ripening of a traditional Spanish goat cheese variety (Babia-Laciana). *International Dairy Journal*, 13, pp.221-230.
- Geissler, C. & Powers, H. (2010) *Human Nutrition*. Churchill Livingstone Elsevier, 12th ed., pp.6.
- Grazier, C.L., Simpson, R.J., Roncagliolo, S., Bodyfelt, F., & Torres, A. (1993) Modelling of time-temperature effects on bacteria population during cooling of Cheddar cheese blocks. *J. Food Process Eng.*, 16, pp.173-190.
- Green, M.L. & Manning, D.J. (1982) Development of texture and flavor in cheese and other fermented products. *J. Dairy Res.*, 49, pp.737-190.
- Gripon, J.C., Monnet, V., Lamberet, G. & Desmazeaud, M.J. (1991) Microbial enzymes in cheese ripening. *Food enzymology*, pp.131–168.
- Hayaloglu, A.A., Tolu, C. & Yasar, K. (2013) Influence of goat breeds and starter culture systems on gross composition and proteolysis in Gokceada goat cheese. *Small Ruminant Research*, 113, pp.231-238.
- Heaney R.P. (2000) Calcium, dairy products and osteoporosis. *J Am Coll Nutr.*, 19, pp.83S-99S.
- Herod, E.L. (1991) The effect of cheese on dental caries: a review of the literature. *Aust Dent J.*, 36(2), pp.120-125.
- Hong, S.H., Belayev, L., Khoutorova, L., Obenaus, A. & Bazan, N.G. (2014) Docosahexaenoic acid confers enduring neuroprotection in experimental stroke. *Journal of the Neurological Sciences*, 338, pp.135-141.
- Hübschmann, H-J. (2009) *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications*. Wiley, 2nd ed., pp.1-3.
- Jarvis, J.K. & Miller G.D. (2002) Overcoming the barrier of lactose intolerance to reduce health disparities. *J Natl Med Assoc.*, 94(2), pp.55-66.
- Kashket, S. & DePaola, D.P. (2002) Cheese consumption and the development and progression of dental caries. *Nutr Rev.*, 60(4), pp.97-103.

- Kim, N.S., Lee, J.H., Han, K.M., Kim, J.W., Cho, S. & Kim, J. (2014) Discrimination of commercial cheeses from fatty acid profiles and phytosterol contents obtained by GC and PCA. *Food Chemistry*, 143, pp.40-47.
- Koba, K. & Yanagita, T. (2013) Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obesity Research & Clinical Practice*, XXX, pp.e1-e8.
- Kondyli, E., Katsiari, M.C., Massouras, T. & Voutsinas, L.P. (2002) Free fatty acids and volatile compounds of low-fat Feta-type cheese made with a commercial adjunct culture. *Food Chemistry*, 79, pp.199–205.
- Kondyli, E., Massouras, T., Katsiari, M.C. & Voutsinas, L.P. (2013) Lipolysis and volatile compounds of Galotyri-type cheese made using different procedures. *Small Ruminant Research*, 113, pp.432–436.
- Lidon, F. & Silvestre, M.M. (2007) *Indústrias Alimentares – Aditivos e Tecnologia*. Escolar Editora, pp.206-211.
- Lidon F. & Silvestre, M.M. (2010) *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*. Escolar Editora, pp.176-178; 186-190; 191-223.
- Ma, N., Hong, S.I., Zhao, T.T., No, D.S., Kim, C-T., Kim, Y & Kim, I-H. (2014) Enrichment of docosahexaenoic acid from tuna oil via lipase-mediated esterification under pressurized carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 87, pp.28-33.
- Macedo, A.C. & Malcata, F.X. (1996) Changes in the Major Free Fatty Acids in Serra Cheese throughout Ripening. *International Dairy Journal*, 6, pp.1087-1097.
- Malacarne, M., Summer, A., Franceschi, P., Formaggioni, P., Pecorari, M., Panari, G. & Mariani, P. (2009) Free fatty acid profile of Parmigiano-Reggiano cheese throughout ripening: Comparison between the inner and outer regions of the wheel. *International Dairy Journal*, 19, pp.637-641.
- Mallatou, H., Pappa, E. & Massouras, T. (2003) Changes in free fatty acids during ripening of Teleme cheese made with ewes', goats', cows' or a mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal*, 13, pp.211–219.
- Mangia, N.P., Murgia, M.A., Garau, G., Sanna, M.G. & Deiana, P. (2008) Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiology*, 25, pp.366–377.
- Manolaki, P., Katsiari, M.C. & Alichanidis, E. (2006) Effect of a commercial adjunct culture on organic acid contents of low-fat Feta-type cheese. *Food Chemistry*, 98, pp.658-663.
- McBean, L.D. & Miller G.D. (1998) Allaying fears and fallacies about lactose intolerance. *J Am Diet Assoc.*, 98(6), pp.671-676.
- McMaster, M.C. (2008) *GC/MS A Practical User's Guide*. Wiley-Interscience, 2nd ed., pp.1-37.
- McSweeney, P.L.H. & Sousa, M.J. (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80, pp.293–324.

- Miller, G.D., Jarvis, J.K. & McBean, L.D. (2000) Handbook of Dairy Foods and Nutrition. National Dairy Council, 2nd ed., pp.41-48.
- Molimard, P. & Spinnler, H.E. (1996) Review: Compounds involved in the flavour of surface mould-ripened cheeses: Origins and properties. Journal of Dairy Science, 79, pp.169–184.
- Monge-Rojas, R., Aragón, M.C., Chinnock, A., Campos, H. & Colón-Ramos, U. (2013) Changes in dietary intake and food sources of saturated and *cis* and *trans* unsaturated fatty acids in Costa Rican adolescents: 1996 versus 2006. Nutrition, 29 (4), pp. 641-645.
- Mouradian, M., Kikawa, K.D., Johnson, E.D., Beck, K.L. & Pardini, R.S. (2014) Key roles for GRB2-associated-binding protein 1, phosphatidylinositol-3-kinase, cyclooxygenase 2, prostaglandin E2 and transforming growth factor alpha in linoleic acid-induced upregulation of lung and breast cancer cell growth. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 90, pp.105-115.
- Moynihan, P.J., Ferrier, S. & Jenkins, G.N. (1999) The cariostatic potential of cheese: cooked cheese-containing meals increase plaque calcium concentration. Br Dent J., 187(12), pp.664-667.
- Mozaffari-Khosravi, H., Yassini-Ardakani, M., Karamati, M. & Shariati-Bafghi, S-E. (2013) Eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid in mild-to-moderate depression: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. European Neuropsychopharmacology, 23, pp.636-644.
- Ong, L. & Shah, N.P. (2009) Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profile. LWT – Food Science and Technology, 42, pp.1260-1268.
- Pappa, E.C., Kandarakis, I., Anifantakis, E.M. & Zerfiridis, G.K. (2006) Influence of types of milk and culture on the manufacturing practices, composition and sensory characteristics of Teleme cheese during ripening. Food Control, 17, pp.570-581.
- Park, Y.W. & Drake, M.A. (2005) Effect of 3 months frozen-storage on organic acid contents and sensory properties, and their correlations in soft goat milk cheese. Small Ruminant Research, 58, pp.291-298.
- Park, Y.W. & Lee, J.H. (2006) Effect of freezing on organic acid contents and lipolytic index of plain soft and Monterey Jack goat milk cheeses. Small Ruminant Research, 63, pp.58–65.
- Parodi, P.W. (2003) Anti-cancer agents in milk fat. Australian Journal of Dairy Technology, 58, pp.114–118.
- Partidário, A.M., Barbosa, M. & Vilas Boas, L. (1998) Free Fatty Acids, Triglycerides and Volatile Compounds in Serra da Estrela Cheese – Changes throughout Ripening. Int. Dairy Journal, 8, pp.873-881.
- Portaria 73/90 de 1 de Fevereiro
(<http://www.dre.pt/pdf1s%5C1990%5C02%5C02700%5C04360438.pdf>).
- Pribila, B.A., Hertzler, S.R., Martin, B.R., Weaver, C.M. & Savaiano, D.A. (2000) Improved lactose digestion and intolerance among African-American adolescent girls fed a dairy-rich diet. J Am Diet Assoc., 100(5), pp.524-528.

- Rehman, S., Banks, J.M., Brechany, E.Y., Muir, D.D., McSweeney, P.H.L. & Fox, P.F. (2000) Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavor of Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 10, pp.55-65.
- Richard, D., Oszust, F., Guillaume, C., Millart, H., Laurent-Maquin, D., Brou, C., Bausero, P. & Visioli, F. (2014) Infusion of docosahexaenoic acid protects against myocardial infarction. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 90, pp.139-143.
- Seitz, E.W. (1990) Microbial and enzyme-induced flavors in dairy foods. *J. Dairy Sci.*, 73, pp.3664-3691.
- Serhan, M., Linder, M., Hosri, C. & Fanni, J. (2010) Changes in proteolysis and volatile fraction during ripening of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Small Ruminant Research*, 90, pp.75-82.
- Shimizu, N., Naito, M., Mori, N. & Kuwahara, Y. (2014) *De novo* biosynthesis of linoleic acid and its conversion to the hydrocarbon (Z,Z)-6,9-heptadecadiene in the astigmatid mite, *Carpoglyphus lactis*: Incorporation experiments with ¹³C-labeled glucose. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45, pp.51-57.
- Sihufe, G.A., Zorrilla, S.E., Mercanti, D.J., Perotti, M.C., Zalazar, C.A. & Rubiolo, A.C. (2007) The influence of ripening temperature and sampling site on the lipolysis in Reggianito Argentino cheese. *Food Research International*, 40, pp.1220-1226.
- Singh, S. & Kristoffersen, T. (1970) Factors affecting flavor development in buffalo milk Cheddar cheese slurries. *J. Dairy Sci.*, 53, pp.533-536.
- Soares, C.P. (2013) Influência da Redução de Sal nas Propriedades do Queijo de São João da Ilha do Pico. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Qualidade Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, pp.39-44, 57.
- Tavará, F.K., Tavares, T.G., Silva-Ferreira, A.C. & Malcata, F.X. (2006) Contribution of coagulant and native microflora to the volatile-free fatty acid profile of an artisanal cheese. *International Dairy Journal*, 16, pp.886–894.
- Urbach, G. (1993) Relations between cheese flavor and chemical composition. *Int. Dairy J.*, 3, pp.389-422.
- Vargas-Bello-Pérez, E., Vera, R.R., Aguilar, C., Lira, R., Peña, I. & Fernández, J. (2013) Feeding olive cake to ewes improves fatty acid profile of milk and cheese. *Animal Feed Science and Technology*, 184, pp.94-99.
- Watkins, B.A. & Li, Y. (2003) CLA in functional food: enrichment of animal products. *Advances in Conjugated Linoleic Acid*, 2, pp. 174–188.
- Wijendran, V. & Hayes, K.C. (2004) Dietary n₆ and n₃ fatty acid balance and cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition*, 24, pp.597–615.

- Wu, D. & He, Y. (2014) Potential of spectroscopic techniques and chemometric analysis for rapid measurement of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in algal oil. *Food Chemistry*, 158, pp.93-100.
- Ya, F., Jing, Z. & Da-Peng, X. (2014) The investigation on the pressure-induced phase transition in linoleic acid by in-situ Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, pp.1-12.
- Yamagata, K., Tusruta, C., Ohtuski, A. & Tagami, M. (2014) Docosahexaenoic acid decreases TNF- α -induced lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 expression in THP-1 cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 90, pp.125-132.
- Yoshioka, K. & Hashimoto, N. (1983) Cellular fatty acid and ester formation by brewers' yeast. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, pp.2287-2294.
- Zhang, R.H., Mustafa, A.F. & Zhao, X. (2006_a) Effect of feeding oilseeds rich in linoleic acid and linoleic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. *Animal Feed Science and Technology*, 127, pp.220-233.
- Zhang, R.H., Mustafa, A.F. & Zhao, X. (2006_b) Effects of flaxseed supplementation to lactating ewes on milk composition, cheese yield, and fatty acid composition of milk and cheese. *Small Ruminant Research*, 63, pp.233-241.
- Zhang, R.H., Mustafa, A.F., Ng-Kwai-Hang, K.F. & Zhao, X. (2006_c) Effects of freezing on composition and fatty acid profiles of sheep milk and cheese. *Small Ruminant Research*, 64, pp.203-210.
- Ziino, M., Condurso, C., Romeo, V., Giuffrida, D. & Verzera, A. (2005) Characterization of "Provola dei Nebrodi", a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS. *International Dairy Journal*, 15, pp.585-593.
- Caderno de Especificações DOP Queijo do Pico. Disponível em www.azores.gov.pt. Acedido em 20 de Dezembro de 2013.

6. Anexos

6.1. Cromatogramas de perfis de ácidos gordos totais

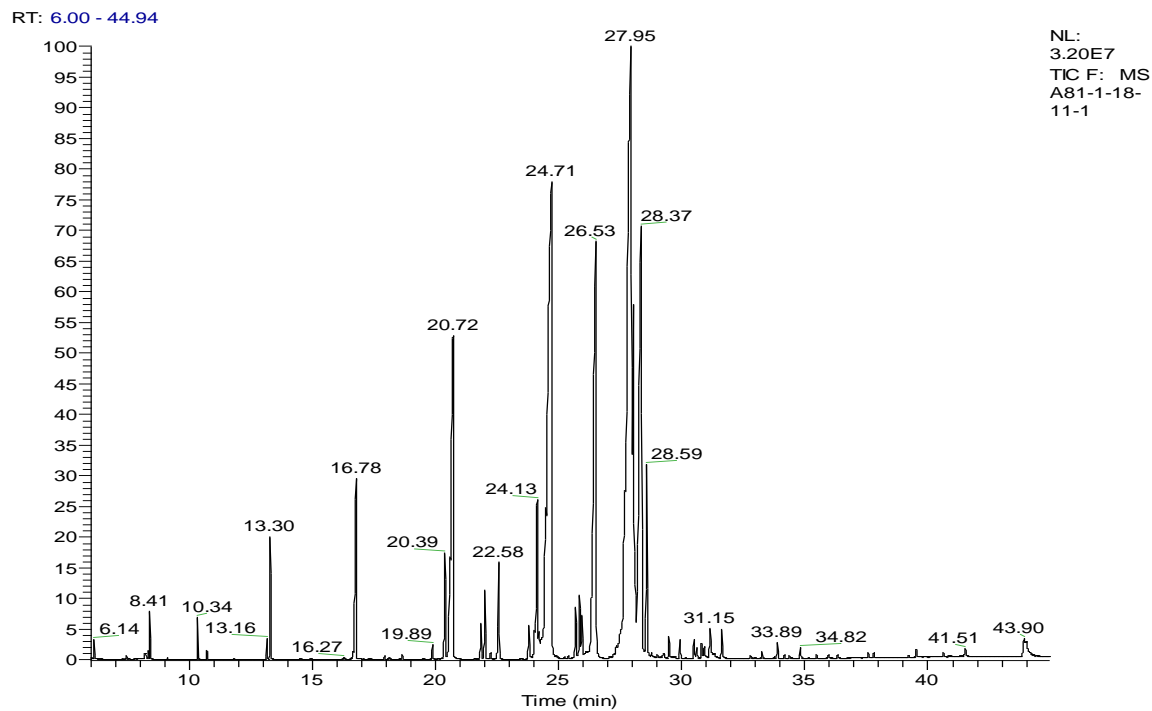


Figura 6.1: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo A-8.

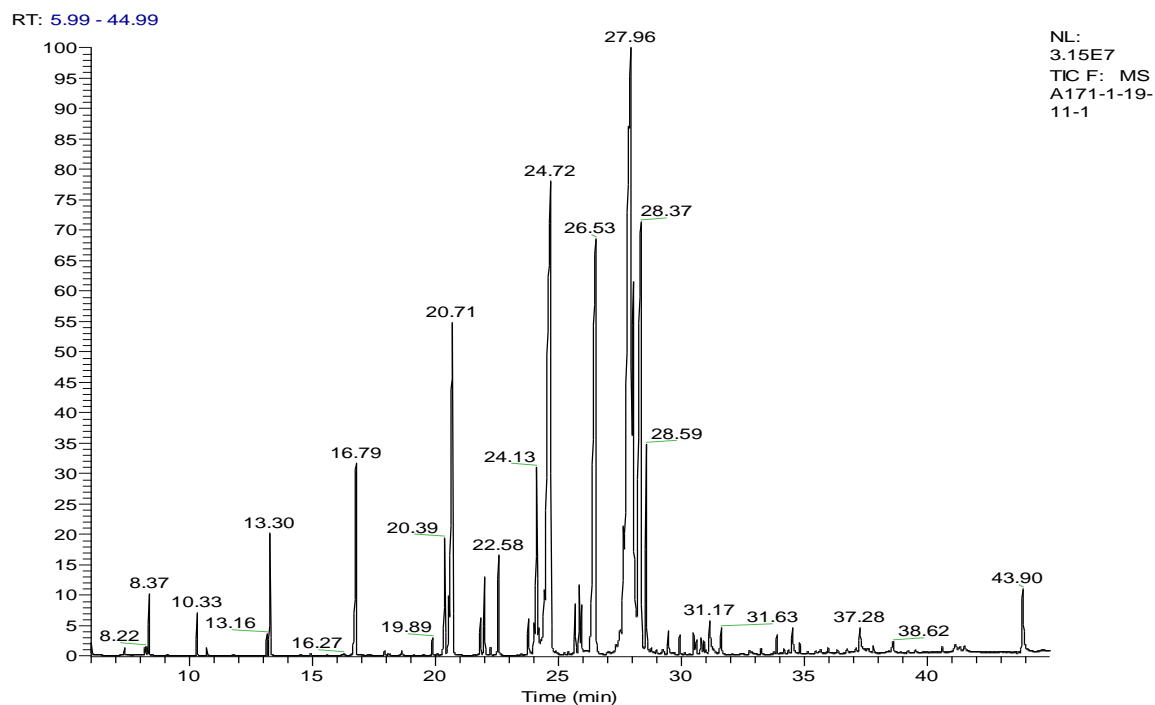
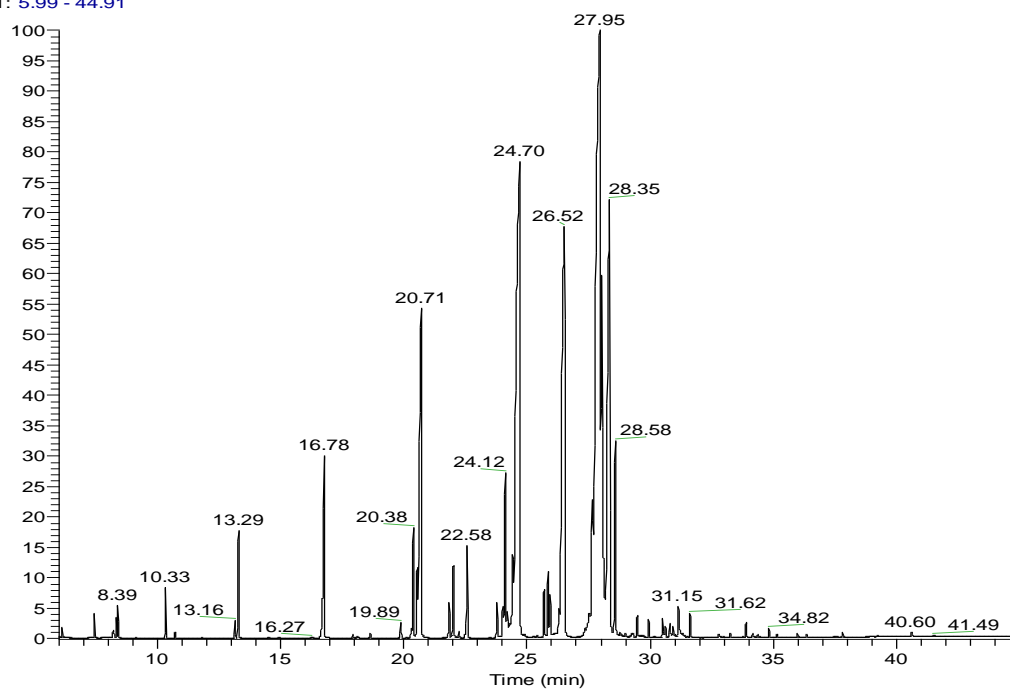


Figura 6.2: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo A-17.

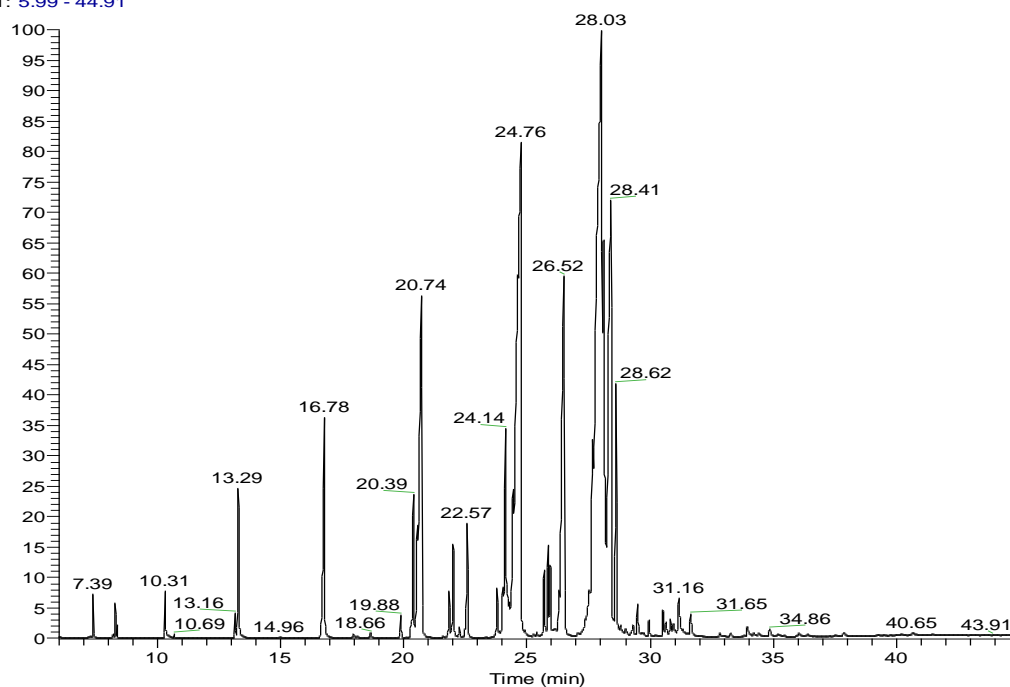
RT: 5.99 - 44.91



NL:
2.95E7
TIC F: MS
A281-1-2-
12-
1_1312021
45738

Figura 6.3: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo A-28.

RT: 5.99 - 44.91



NL:
6.35E7
TIC F: MS
A401-1-14-
1-1

Figura 6.4: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo A-40.

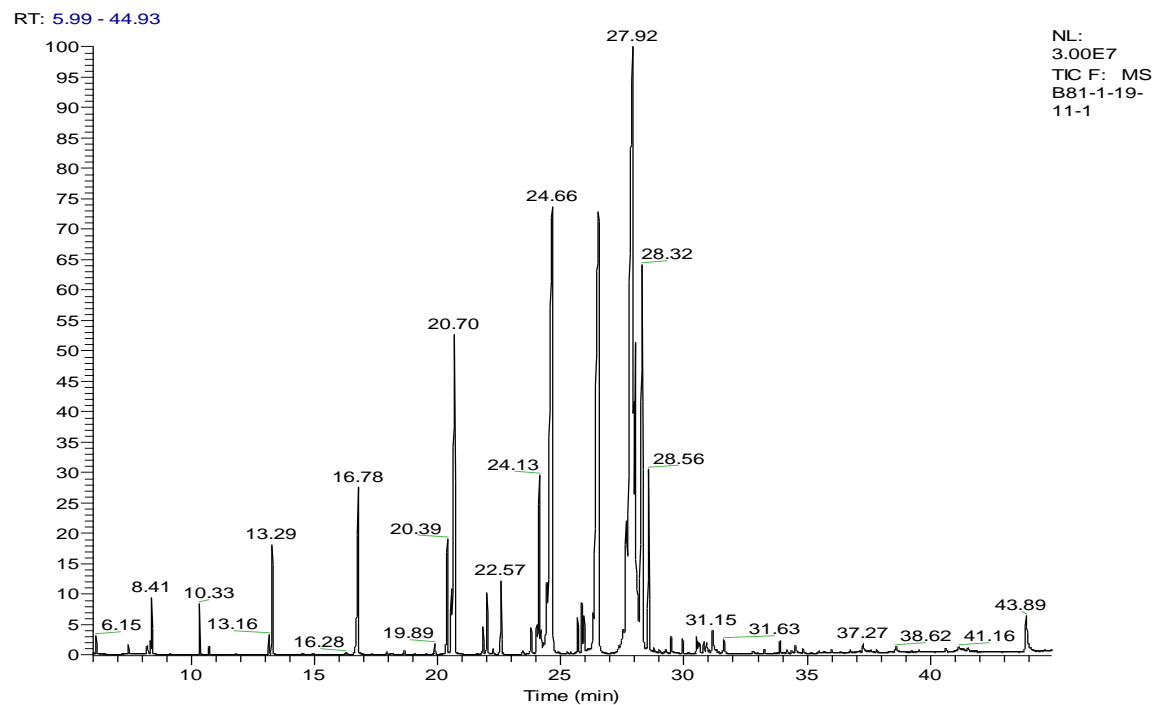


Figura 6.5: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo B-8.

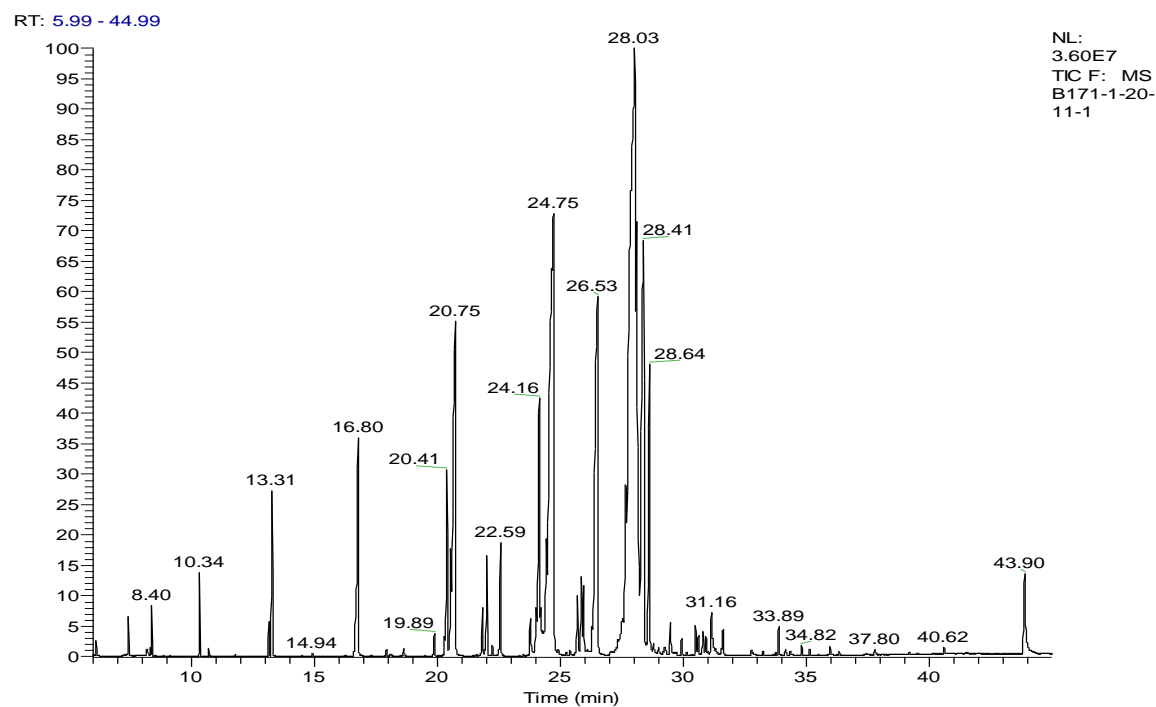


Figura 6.6: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo B-17.

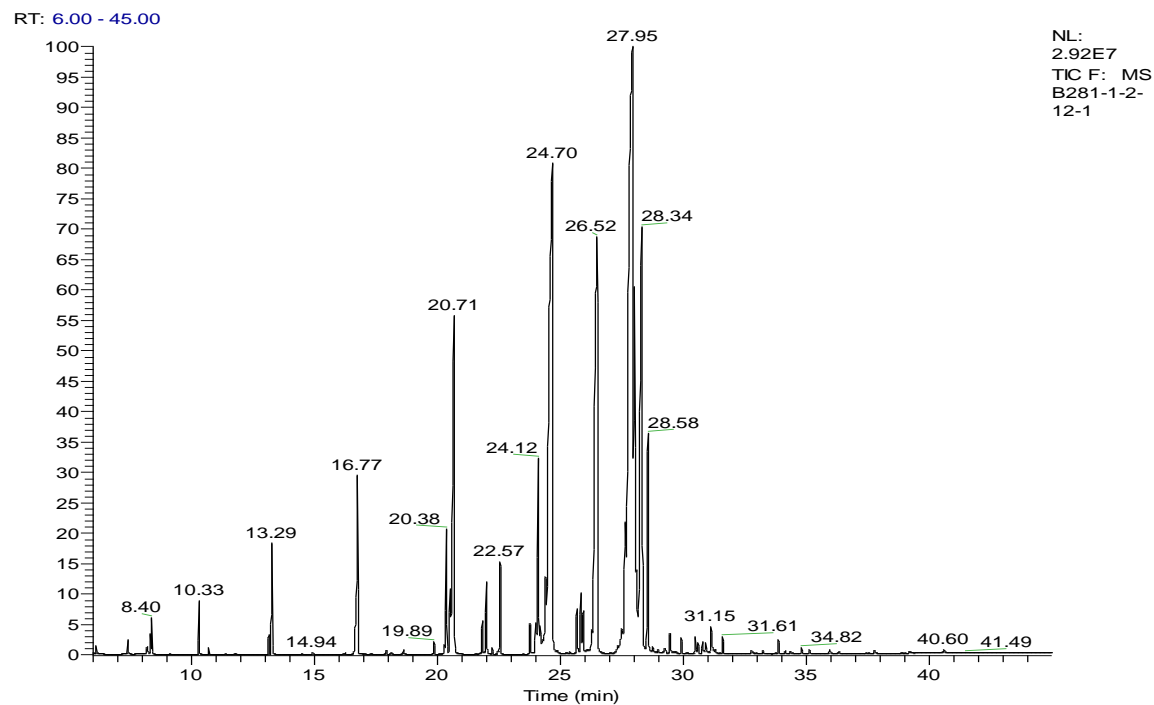


Figura 6.7: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo B-28.

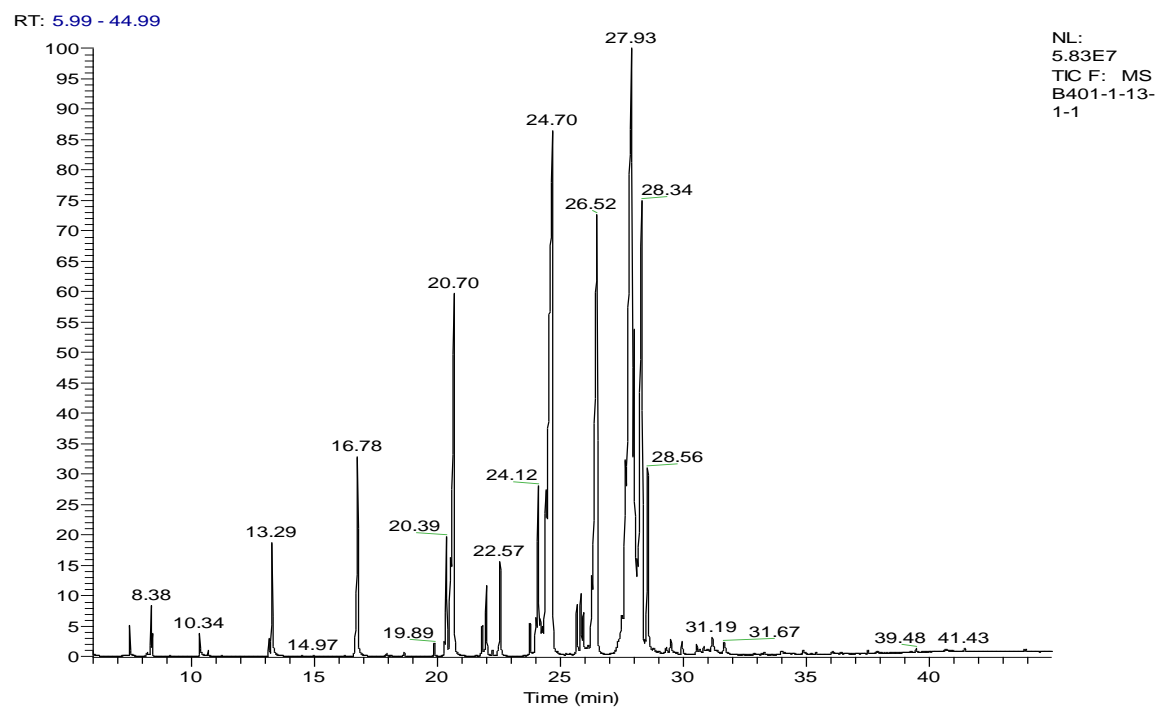


Figura 6.8: Cromatograma do perfil de ácidos gordos totais do queijo B-40.